

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

**Evaluation pharmacologique de modulateurs de la cascade de l'acide arachidonique
sue cellules endothéliales et dans un modèle murin d'athérosclérose.**

Genon, Stéphanie

Award date:
2007

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

**Evaluation pharmacologique de modulateurs de la cascade de l'acide
arachidonique sur cellules endothéliales et dans un modèle murin
d'athérosclérose**

GENON Stéphanie

Résumé

L'athérosclérose est une pathologie multifactorielle complexe qui est responsable de la cause majeure de mortalité d'origine cardiovasculaire. Elle consiste en un remaniement de l'intima par accumulation de lipides, de glucides, de cellules du sang, de tissus adipeux et une calcification.

L'objectif de ce travail s'inscrit dans le cadre de l'évaluation de modulateurs de la voie du thromboxane A₂ dans la pathologie athéromateuse. En effet, le thromboxane A₂ est un médiateur cellulaire lipidique aux propriétés vaso- et broncho-constrictrices capable d'induire l'agrégation plaquettaire, l'activation endothéliale et la prolifération des cellules musculaires lisses.

Dans un premier temps, les effets du BM-573, une molécule originale, inhibitrice de la thromboxane synthétase et antagoniste du récepteur au thromboxane A₂, ont été évalués *in vitro* dans un modèle de cellules endothéliales en culture et comparés à des molécules de références.

Dans un second temps, l'aspirine a été investiguée dans un modèle murin d'athérosclérose utilisant des souris déficientes pour l'apoprotéine E et comparée au BM-573. L'association de ces deux molécules a également été étudiée. Nous avons été en mesure de démontrer que l'aspirine, comme le BM-573, diminuait l'étendue des lésions athéromateuses et la production de thromboxane A₂. Seul le BM-573 est capable de réduire les concentrations de marqueurs de l'inflammation tels VCAM-1s et MCP-1. L'aspirine s'est montrée moins efficace que le BM-573. Le BM-573, une sulfonilurée nitrobenzénique originale s'avère être un candidat prometteur dans la prévention de l'athérogenèse.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2007

Promoteur: Prof. B. Masereel

Copromoteur: Prof. J.M. Dogné

Au terme de ce mémoire, je tiens à faire part de ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué à l'élaboration de ce travail ainsi qu'à tous ceux qui m'ont soutenue durant ces quatre années d'études.

Je tiens tout d'abord à remercier mes promoteurs ; monsieur le professeur B. Masereel pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire ainsi que pour son encadrement et monsieur le professeur J.M. Dogné pour ses conseils avisés et son enthousiasme.

Je remercie également le Docteur Stéphanie Rolin-Beauthier pour son encadrement tout au long de ce travail. Je n'oublierai pas ton dynamisme, ta disponibilité et surtout ton optimisme et ta sympathie. J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi durant ces 6 mois, tu m'as beaucoup appris et je t'en remercie.

Je remercie tous les membres du département de pharmacie pour leurs conseils ainsi que leur accueil chaleureux. Je remercie particulièrement Anne pour l'aide qu'elle m'a apportée dans le cadre des manipulations in vitro ainsi que de toute la sympathie dont elle a fait preuve à mon égard.

Je tiens à remercier le laboratoire URBC pour le matériel et l'aide qu'ils m'ont fournis. Merci tout spécialement au professeur Carine Michiels, je lui suis très reconnaissante pour tout le soutien et les conseils qu'elle m'a apportés ainsi que de tout le temps qu'elle m'a consacré.

Les manipulations in vivo ont été réalisées au CREDEC du CHU (ULg), c'est pourquoi je tiens à remercier le professeur Jean-Olivier Defraigne de m'avoir accueillie dans son laboratoire ainsi que toute l'équipe pour son accueil. Un grand merci à Céline pour ses conseils et bien entendu, pour son encadrement, sa disponibilité et sa patience durant mes premières manipulations avec le modèle murin. Je tiens également à remercier l'animalerie centrale du CHU (ULg), en particulier le Docteur P.v. Drion, le service d'anatomie pathologique du professeur Jacques Boniver (CHU, ULg) pour l'examen histologique des aortes ainsi que l'Institut de pathologie et de génétique de Gosselie pour l'évaluation macroscopique des aortes.

Ma gratitude va également à tous les mémorants d'URBC sur qui j'ai toujours pu compter, merci de tous les bons moments que nous avons passés ensemble et pour la bonne ambiance que vous avez apportée durant cette dernière année d'étude.

Je suis profondément reconnaissante à Géraldine, ma colocataire pour son soutien, sa franchise et pour toutes nos discussions sans fin. Merci pour ta présence au quotidien, ton humour et ta spontanéité.

Pour terminer, elle est sans doute la dernière remerciée mais certainement pas la moindre, merci à ma famille. Je suis reconnaissante à mes parents pour le soutien qu'ils m'ont donné jour après jour durant quatre ans. Merci à mon frère pour ne jamais avoir douté de moi, pour l'expérience dont il m'a fait profiter. Aujourd'hui je leur suis redevable car rien n'aurait pu être accompli sans leur présence, leur patience et leur tolérance.

Liste des abréviations

12/15 LOX : 12,15 Lipooxygénase
ASA : Acide acétylsalicylique
ABC : *ATP Binding Cassette*
AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
APOBEC : Apolipoprotein cytidine deaminase
BAEC : *Bovine Aortic Endothelial Cell*
CETP : *Cholesterol Ester Transfert Protein*
CML : Cellules Musculaires Lisses
COX : Cyclooxygénase
DMSO : Diméthyle sulfoxyde
EDHF : *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*
ESL-1 : E-selectin glycoprotein ligand
FGF : *Fibroblast Growth Factor*
GPCR : *G Protein Coupled Receptor*
HAEC : *Human Aortic Endothelial Cell*
HDL : *High Density Lipoprotein*
HPETE : *Hydroperoxyeicosatetranoic*
HRP : *Horse Radish Peroxidase*
HUVEC : *Human Umbilical Vein Endothelial Cell*
ICAM : *InterCellular Adhesion Molecule*
IDL : *Intermediate Density Lipoprotein*
IFN γ : Interféron gamma
iNOS : NO synthétase inductible
IP₃ : Inositol triphosphate
KO : *Knock-Out*
LCAT : *Lecitine Cholesterol Acyl Transferase*
LDL : *Low Density Lipoprotein*
mmLDL : *Minimally Modified Low Density Lipoprotein*
oxLDL : *oxdized Low Density Lipoprotein*
Lp(a) : Lipoprotéine a
LPL : Lipoprotéine Lipase
LRP : *LDL Receptor Related Protein*
MCP1 : *Monocyte Chemoattractant Protein*
M-CSF : *Macrophage Colony Stimulating Factor*
MEC : Matrice ExtraCellulaire
NF- κ B : *Nuclear Factor kappa binding*
NO : Monoxyde d'azote
PAF : *Platelet Activating Factor*
PDGF : *Platelet Derived Growth Factor*
PCAM : *Platelet/endothelial Cell Adhesion Molecule*
PGG₂ : Prostaglandine G₂
PGH₂ : Prostaglandine H₂
PGI₂ : Prostaglandine I₂ (prostacycline)
PLA₂ : Phospholipase A₂
PRP : Plasma Riche en Plaquettes
PPP : Plasma Pauvre en Plaquettes
PSG-L1 : *P-selectin glycoprotein ligand 1*
RLDL : Récepteur aux LDL

ROS : *Reactive Oxygen Species*

TNF α : *Tumor Necrosis Factor*

TP-R : Récepteur au thromboxane A₂

TXA₂ : Thromboxane A₂

TXSI : *Thromboxane Synthase Inhibitor*

V-CAM : *Vascular Cell Adhesion Molecule*

VLDL : *Very Low Density Lipoprotein*

Table des matières

I.	Introduction	1
I.1.	L'athérosclérose	1
I.1.1.	Le métabolisme des lipoprotéines	1
I.1.1.1.	Les lipoprotéines	1
I.1.1.2.	Les récepteurs aux lipoprotéines	3
a.	Les récepteurs aux LDL natives	3
b.	Les récepteurs <i>scavengers</i>	3
I.1.1.3.	Le métabolisme des lipoprotéines	3
a.	Les chylomicrons	3
b.	Les VLDL et les LDL	4
c.	Les HDL	4
I.1.1.4.	Maladies associées à un dysfonctionnement du métabolisme des lipoprotéines.	4
a.	L'hypercholestérolémie familiale	5
b.	La dysbétalipoprotéïnémie	5
I.1.2.	Définition de l'athérosclérose	5
I.1.3.	Structure d'une artère saine	6
I.1.4.	Rôle de l'endothélium	6
I.1.4.1.	Régulation du tonus vasculaire	6
I.1.4.2.	Régulation de l'équilibre thrombotique	7
I.1.4.3.	Régulation de la réponse inflammatoire	7
I.1.5.	Formation des lésions athéromateuse	8
I.1.5.1.	Initiation de la lésion athéromateuse	8
I.1.5.2.	La strie lipidique	9
I.1.5.3.	La chape fibreuse	9
I.1.5.4.	La plaque athéromateuse	9
I.1.5.5.	Les complications	10
b.	La thrombose	10
c.	La néovascularisation	10
d.	La calcification	11
I.1.6.	Quelques modèles animaux	11
I.1.6.1.	Généralités	11
I.1.6.2.	Le modèle de souris apoE ^{-/-}	11
I.1.6.3.	Le modèle de souris LDLR ^{-/-}	12
I.1.6.4.	Les modèles de souris double <i>knock-out</i>	12
I.2.	Médiateurs issus de l'acide arachidonique impliqués dans la pathologie athérosclérose	13
I.2.1.	Le thromboxane A ₂	13
I.2.1.1.	La cascade de l'acide arachidonique	13
a.	L'acide arachidonique	13
b.	La voie des cyclooxygénases	13
c.	Les prostanoïdes	14
I.2.1.2.	Le rôle du thromboxane A ₂	14
I.2.1.3.	Le récepteur TP	15
I.2.1.4.	Le rôle du récepteur TP dans l'athérosclérose	15
I.2.2.	Les isoprostanes	16
I.2.2.1.	Formation des isoprostanes	16
I.2.2.2.	L'isoprostane 8- <i>iso</i> -PGF _{2α}	16

I.2.2.3.	Biologie vasculaire des isoprostanes.....	16
I.2.2.4.	Rôle des isoprostanes dans l'athérosclérose.....	17
I.2.3.	Les modulateurs de la voie du thromboxane A ₂	17
I.2.3.1.	Les inhibiteurs de la thromboxane synthétase	17
I.2.3.2.	Les agonistes du récepteur TP.....	18
I.2.3.3.	Les antagonistes du récepteur TP.....	18
I.2.3.4.	Les agents mixtes	18
I.2.3.5.	Vers de nouvelles molécules	19
I.3.	Objectifs	20
II.	Matériel et méthodes	22
II.1.	Manipulation <i>in vitro</i>	22
II.1.1.	Culture cellulaire	22
II.1.1.1.	Lignée cellulaire	22
II.1.1.2.	Culture des cellules	22
a.	Matériel	22
b.	Méthode.....	22
II.1.2.	Stimulation des cellules.....	23
II.1.2.1.	Les médiateurs.....	23
II.1.2.2.	Méthode.....	23
II.1.3.	Dosage du MCP-1	23
II.1.3.1.	Principe.....	23
II.1.3.2.	Dosage des protéines au Folin.....	24
a.	Principe.....	24
b.	Matériel	24
c.	Méthode.....	24
II.1.3.3.	Dosage du MCP-1	24
a.	Principe.....	24
b.	Matériel	25
c.	Méthode.....	25
II.1.4.	Immunofluorescence	25
II.1.4.1.	Principe.....	25
II.1.4.2.	Matériel	25
II.1.4.3.	Méthode.....	25
II.1.5.	Western blot	26
II.1.5.1.	Lysats cellulaires	26
a.	Matériel	26
b.	Méthode.....	26
II.1.5.2.	Dosage de Bradford.....	26
a.	Principe.....	26
b.	Matériel	27
c.	Méthode.....	27
II.1.5.3.	Electrophorèse	27
a.	Principe.....	27
b.	Matériel	27
c.	Méthode.....	27
II.1.5.4.	Révélation.....	28
a.	Principe.....	28
b.	Matériel	28
c.	Méthode.....	28
II.2.	Manipulation <i>in vivo</i>	29

II.2.1.	Traitement des souris apoE ^{-/-}	29
II.2.2.	Prélèvement sanguin	29
II.2.2.1.	Matériel	29
II.2.2.2.	Méthode.....	30
II.2.3.	Dosage plasmatique.....	30
II.2.3.1.	Dosage lipidique.....	30
II.2.3.2.	Dosage de sICAM-1, sVCAM-1 et de MCP-1	30
a.	Principe.....	30
b.	Matériel	30
II.2.3.3.	Dosage de TXB ₂	30
a.	Principe.....	30
b.	Matériel	31
II.2.4.	Méthode « en face »	31
II.2.4.1.	Prélèvement de l'aorte.....	31
a.	Matériel	31
b.	Méthode.....	31
II.2.5.	Coupes histologique	32
II.2.5.1.	Prélèvement de l'aorte.....	32
a.	Matériel	32
b.	Méthode.....	32
II.2.5.2.	Histologie sur prélèvements inclus en paraffine	32
a.	Coloration H&E	32
b.	Coloration à l'orcéine.....	32
II.2.5.3.	Histologie sur prélèvements congelés	33
a.	Coloration Oil Red O	33
b.	Coloration H&E	33
II.3.	Analyses statistiques	33
III.	Résultats et discussion	35
III.1.	Evaluation <i>in vitro</i> de modulateurs du TXA ₂ sur cellules endothéliales.....	35
III.1.1.	Evaluation de molécules agonistes et antagonistes du récepteur TP sur la production de MCP-1 par les cellules endothéliales EAhy926.....	35
III.1.1.1.	Stimulation avec les agonistes du récepteur TP	36
a.	Mode opératoire	36
b.	Résultats avec les agents stimulants.....	36
c.	Conclusion.....	37
III.1.1.2.	Effets d'antagonistes du récepteur TP.....	37
a.	Mode opératoire	37
b.	Résultats avec le SQ-29548.....	38
c.	Résultats avec le BM-573	38
d.	Conclusion.....	38
III.1.2.	Evaluation de molécules agonistes du récepteur TP sur l'expression d'ICAM-1 en surface des cellules EAhy926.....	38
III.1.2.1.	Mode opératoire	39
III.1.2.2.	Analyse des résultats	39
III.1.2.3.	Conclusion.....	39
III.1.3.	Discussion de l'étude sur cellules endothéliales	39
III.2.	Evaluation <i>in vivo</i> de modulateurs du TXA ₂ chez des souris athéromateuses.....	42
III.2.1.	Dosages plasmatiques	43
III.2.1.1.	Les lipides	43
a.	Analyse des résultats	43

b.	Conclusion.....	44
III.2.1.2.	Dosage du TXB ₂	44
a.	Analyse des résultats	44
b.	Conclusion.....	44
III.2.1.3.	Dosage des marqueurs de l'inflammation.....	45
a.	Analyse des résultats pour MCP-1	45
b.	Analyse des résultats pour ICAM-1	45
c.	Analyse des résultats pour VCAM-1	45
d.	Conclusion.....	46
III.2.2.	Analyse des lésions athéromateuses.....	46
III.2.2.1.	Quantification des plaques d'athérosclérose par la méthode « en face ».	46
III.2.2.2.	Analyse des coupes histologiques	47
III.2.2.3.	Conclusion.....	48
III.2.3.	Discussion de l'étude sur les souris athéromateuses.....	48
IV.	Conclusions et perspectives	53
V.	Bibliographie	56

I. INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires englobent un vaste ensemble de pathologies et d'organes cibles ; elles représentent selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) la première cause de morbidité et de mortalité dans le monde. De plus, selon la même source, les cardiopathies ischémiques sont à l'origine de près de 30% des décès. Les facteurs de risque cardiovasculaire sont multiples, en progression perpétuelle et prennent aujourd'hui une importance considérable en terme de Santé Publique.

La pathologie multifactorielle appelée « athérosclérose » est à l'origine de très nombreuses maladies cardiovasculaires. Les complications de cette pathologie sont en effet responsables de l'obstruction partielle voire totale des artères suite à la formation de plaques fibro-lipidiques sur la face interne des parois de ces dernières. Ainsi, les cardiopathies ischémiques et les accidents vasculaires cérébraux sont responsables des deux premières causes de mortalité dans le monde.

En raison du rôle prépondérant des lipides et des cellules endothéliales dans l'athérosclérose, la première partie de l'introduction sera consacrée au métabolisme des lipoprotéines et au rôle de l'endothélium vasculaire. La progression des lésions sera ensuite décrite, de la strie lipidique jusqu'à la complication des plaques fibro-lipidiques. Dans ce même chapitre, nous aborderons différents modèles animaux d'athérosclérose. Pour terminer, les modes d'action et les rôles de certains médiateurs impliqués dans la pathologie athéromateuse seront présentés.

I.1. L'athérosclérose

I.1.1. Le métabolisme des lipoprotéines

L'athérosclérose est étroitement liée au métabolisme des lipoprotéines. L'hypercholestérolémie est un facteur de risque important dans cette pathologie. En effet, la première étape de la maladie consiste en une accumulation de lipides dans la paroi des artères sur une période pouvant couvrir plusieurs décennies. Ces lipides proviennent de lipoprotéines dites de faible densité, constituées essentiellement de cholestérol. La modification des constituants de ces lipoprotéines est l'événement déclencheur dans l'initiation des lésions.

I.1.1.1. Les lipoprotéines

Comme d'autres lipides tels les triglycérides et les phospholipides, le cholestérol, ne peut se déplacer sous forme libre dans un milieu aqueux comme le plasma en raison de son caractère hydrophobe. Ce déplacement nécessite, en effet, la formation de complexes macromoléculaires solubles nommés lipoprotéines.

Dans ces complexes, le cœur lipidique hydrophobe composé d'esters de cholestérol et de triglycérides est recouvert d'une enveloppe amphiphile dont les constituants principaux sont les phospholipides, le cholestérol non estérifié (libre) et les apolipoprotéines ou apoprotéines (Figure 1). L'association à ces protéines permet le transport dans les fluides corporels. Les apolipoprotéines confèrent à chaque édifice lipoprotéique ses propriétés fonctionnelles et son devenir métabolique; c'est en quelque sorte la carte de visite de la lipoprotéine.

Les lipoprotéines sont aussi importantes d'un point de vue physiologique que dans le diagnostic clinique.

Les lipoprotéines de plus faible densité sont appelées les chylomicrons. Les VLDL (*very low density lipoprotein*), les LDL (*low density lipoprotein*) et les HDL (*high density lipoprotein*) sont des lipoprotéines de plus en plus denses. Enfin, la lipoprotéine a (Lp(a)) est une lipoprotéine structurellement voisine des LDL et qui connaît un intérêt grandissant depuis que plusieurs études épidémiologiques ont montré qu'un taux élevé de Lp(a) était associé à des lésions athéromateuses prématurées.

La taille des lipoprotéines varie de manière inverse par rapport à la densité. La différence de densité des lipoprotéines s'explique par des proportions variables en lipides et en protéines. Ainsi, les chylomicrons sont les particules les plus riches en triglycérides et comportent une faible quantité de protéines (2%) alors que les HDL sont constituées de 70% de protéines et de 30% de cholestérol. Les apoprotéines font partie intégrante des lipoprotéines ; elles présentent en surface de celle-ci, du côté plasmatique, les acides aminés à chaîne latérale hydrophile, tandis que les acides aminés à chaîne latérale hydrophobe sont dirigés vers le cœur de la particule. Outre leur rôle structural, ces apoprotéines sont par ailleurs nécessaires d'une part, comme cofacteur pour certaines enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique et, d'autre part, comme ligand pour des récepteurs aux lipoprotéines.

Parmi ces protéines se trouvent principalement :

- **L'apoA1** : constituant des HDL, participe comme cofacteur à l'activité de la lécithine cholestérol acyle transférase (LCAT) responsable de l'estérification du cholestérol plasmatique.
- **L'apoB48** : constituant des chylomicrons, est la forme tronquée de l'ApoB100.
- **L'apoB100** : constituant des VLDL et des LDL, ligand des récepteurs aux LDL.
- **L'apoC** : constituant des chylomicrons, des VLDL et des HDL, participe à l'activité enzymatique de la LCAT pour l'ApoCI et à l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL), hydrolysant les triglycérides pour l'ApoCII.
- **L'apoE** : constituant de toutes lipoprotéines excepté des LDL, est le ligand des récepteurs LRP (*LDL-receptor related protein*) et des récepteurs aux LDL.

Les données épidémiologiques indiquent qu'un taux plasmatique élevé en LDL, les lipoprotéines riches en cholestérol, constitue un facteur de risque important dans les pathologies cardiovasculaires. C'est pourquoi les LDL sont qualifiées de « mauvais cholestérol ». Par contre, le taux d'HDL, acteur déterminant dans le transport inverse du cholestérol vers le foie, est inversement corrélé au risque de développer une maladie cardiovasculaire; les HDL sont donc nommées plus familièrement « bon cholestérol ». Ils exercent donc un effet protecteur dans la pathologie ; ceci est imputable aux enzymes antioxydantes comme la paraoxanase catalysant la dégradation des LDL oxydées. De plus, les HDL favorisent le processus antithrombotique et la vasorelaxation freinant ainsi l'apparition de thrombus.

Lors de l'initiation des lésions, les LDL subissent des modifications suite à une attaque par les espèces réactives de l'oxygène ou ROS (*reactive oxygen species*) produites par les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. L'oxydation des LDL (Figure 2) débute par un enrichissement en hydroperoxydes lipidiques dont la principale source est la 12,15 lipoxygénase, l'enzyme responsable de l'insertion d'une molécule d'oxygène dans les acides gras polyinsaturés. L'accumulation des hydroperoxydes lipidiques et la présence de ROS vont entraîner la génération de manière non enzymatique d'acides gras

polyinsaturés au sein de la particule, par peroxydation. A ce stade, les LDL sont appelées « *minimally modified LDL* » (mmLDL) et l'apoB100 n'étant pas modifiée, elle constitue toujours un ligand reconnu par les récepteurs aux LDL natives. L'amplification de l'oxydation conduit aux LDL oxydées (oxLDL) avec une altération de l'apoB100 par les dérivés aldéhydes issus de l'oxydation des lipides. Dès lors, les oxLDL ne sont plus reconnus par le récepteur à l'apoB100 mais bien par d'autres récepteurs, les récepteurs éboueurs ou *scavengers* (Sc-R).

I.1.1.2. Les récepteurs aux lipoprotéines

a. Les récepteurs aux LDL natives

Les récepteurs aux LDL natives possèdent cinq domaines (Figure 3). Le domaine N-terminal, situé du côté extracellulaire, est le domaine de reconnaissance de l'apoB100. L'interaction avec le domaine de reconnaissance du récepteur se fait au niveau des lysines de l'apoB100 qui par leurs charges positives facilitent la liaison au récepteur. Le récepteur est également composé de deux domaines glycosylés et d'un domaine transmembranaire. Le domaine cytosolique, soit l'extrémité C-terminale de la protéine, est nécessaire pour l'invagination de la membrane plasmique et la formation de vésicules lors de l'endocytose. L'expression des récepteurs aux LDL natives est régulée par la concentration en cholestérol intracellulaire.

b. Les récepteurs scavengers

Les récepteurs *scavengers* se subdivisent en huit classes de récepteurs (A-H). En condition physiologique, ces récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance des cellules apoptotiques, des bactéries, des LDL modifiées et des lipoprotéines HDL et LDL natives.

Les récepteurs *scavengers* sont responsables de l'endocytose des oxLDL par les macrophages de l'intima qui se différencient alors en cellules spumeuses. Si, le récepteur de la classe A, SR-A est surexprimé par les macrophages présents dans les lésions, son rôle dans l'absorption des oxLDL reste cependant méconnu. Par contre, CD36, un récepteur de la classe B, joue un rôle prédominant dans l'accumulation des oxLDL et est considéré comme un facteur favorisant l'athérogenèse. Contrairement aux récepteurs des LDL natives, les récepteurs *scavengers* ne sont pas régulés par la concentration en cholestérol intracellulaire.

I.1.1.3. Le métabolisme des lipoprotéines

a. Les chylomicrons

L'absorption des lipides provenant de l'alimentation et des sels biliaires se produit au niveau du plateau strié de l'épithélium intestinal. Les lipides sont ensuite assemblés dans l'entérocyte au sein de complexes appelés chylomicrons, les particules les plus riches en triglycérides et associées à l'apoprotéine B48.

L'apoB48 est la forme tronquée de l'apoB100 par édition de l'ARN messager. L'enzyme responsable est l'APOBEC, une cytidine désaminase, qui introduit un codon stop prématurément dans la séquence codant pour l'apoprotéine. Ensuite les chylomicrons formés sont sécrétés par exocytose au pôle basal de l'entérocyte où ils rejoindront le chyle et la circulation sanguine. Au cours de leur transport, les chylomicrons subissent un processus de maturation qui consiste, dans un premier temps, en l'acquisition de l'apoprotéine CII.

L'apoCII est nécessaire en tant que cofacteur de la lipoprotéine lipase (LPL) ancrée en surface de l'endothélium des capillaires sanguins. La LPL est responsable de l'hydrolyse des triglycérides en acides gras libres, redistribués par les cellules endothéliales aux tissus environnants. Dans un second temps, les chylomicrons résiduels, enrichis en cholestérol et en esters de cholestérol, acquièrent l'apoE. L'apoE est le ligand des récepteurs hépatiques LRP, spécifiques des apoE et qui permettent l'endocytose par les hépatocytes (Figure 4).

b. Les VLDL et les LDL

Dans les hépatocytes, le cholestérol et les triglycérides forment des complexes, les VLDL, enrichis en cholestérol par rapport aux chylomicrons (Figure 4).

Les VLDL, comme les chylomicrons, sont envoyées dans la circulation sanguine où elles subiront des modifications analogues. Dans les vaisseaux sanguins, l'apoCII est intégrée aux VLDL. Lors de la perte progressive des triglycérides par action de la LPL, les VLDL vont incorporer l'apoE nécessaire à la reconnaissance par le récepteur pour une éventuelle réabsorption par le foie des VLDL résiduelles. Les VLDL résiduelles sont aussi nommées IDL (*intermediate density lipoprotein*) ; ce sont les complexes qui donnent naissance aux LDL. L'hydrolyse des triglycérides contenus dans les IDL peut également se faire par une autre enzyme, la lipase hépatique. Après dégradation des triglycérides, les IDL sont enrichies en esters de cholestérol par transfert du cholestérol contenu dans les HDL. Ce transfert de cholestérol se déroule sous l'action de la protéine CETP (*cholesterol ester transfert protein*) située à la surface des HDL. Ces complexes enrichis en esters de cholestérol et constitués en majorité par l'apoB100 sont les LDL qui sont reconnues par les récepteurs aux LDL (RLDL) dont le ligand est l'apoB100 mais aussi l'apoE.

c. Les HDL

Les HDL, formées dans l'intestin ou le foie, sont caractérisées par une proportion élevée en protéines (70%). L'apoprotéine majeure constituant les HDL est l'apoA1. Les HDL se distinguent aussi par la présence d'enzymes comme la LCAT, la CETP ou encore la paraoxanase, l'enzyme antioxydante à action protectrice contre l'oxydation des LDL dont le rôle est prépondérant dans la formation des lésions.

Les HDL constituent la réserve d'esters de cholestérol. Au moment de leur formation dans l'intestin, les HDL sont pratiquement dépourvues d'esters de cholestérol. C'est ultérieurement que la LCAT, dont l'activité dépend de l'apoA1, permet la capture du cholestérol qui va s'accumuler progressivement au cœur des HDL. La CETP, comme évoqué ci-dessus, permet ensuite le transfert du cholestérol aux autres lipoprotéines. Au cours de leur maturation, les HDL acquièrent diverses apolipoprotéines. En effet, les HDL constituent aussi le réservoir d'apoE et d'apoC aux rôles importants dans le métabolisme des lipoprotéines.

I.1.1.4. Maladies associées à un dysfonctionnement du métabolisme des lipoprotéines.

Il existe de nombreuses maladies associées à un dysfonctionnement du métabolisme des lipoprotéines. Les dyslipidémies d'origine génétique, sont néanmoins conditionnées par des facteurs environnementaux. La classification phénotypique de Fredrickson distingue ces hyperlipidémies en fonction des désordres métaboliques qu'elles engendrent. Ces anomalies du métabolisme lipidique sont généralement liées à une déficience en un récepteur des lipoprotéines ou en une apoprotéine d'importance primordiale dans le métabolisme lipidique.

Parmi ces dyslipidémies, l'hypercholestérolémie familiale et la dysbétalipoprotéinémie sont à l'origine d'accidents cardiovasculaires liés à une athérosclérose précoce.

a. L'hypercholestérolémie familiale

L'hypercholestérolémie familiale, une dyslipidémie de type IIa selon la classification de Fredrickson, est une maladie génétique qui se caractérise par un taux plasmatique élevé en cholestérol. Les gènes mutés, à l'origine de cette pathologie, sont les gènes codant pour le récepteur aux LDL et pour l'apoB100, deux protéines impliquées dans le catabolisme des LDL. Les mutations au sein de ces gènes induisent différents désordres fonctionnels à l'origine de la suppression de la voie de dégradation des LDL. Parmi ces mutations, certaines touchent soit le niveau d'expression de ces protéines, soit leur structure. Par exemple, le domaine de reconnaissance de l'apoB100 ou encore le domaine cytosolique du récepteur au LDL peuvent être altérés, empêchant ainsi l'internalisation des LDL.

Chez les sujets atteints de cette maladie, une surcharge plasmatique en LDL est observée et se traduit au niveau de la symptomatologie par des dépôts de cholestérol au niveau des tendons et de la peau formant des xanthomes tendineux mais également au niveau des artères formant des athéromes. Le taux de LDL peut tripler chez les individus hétérozygotes voire être multiplié par 6 chez les individus homozygotes pour le gène muté. Les individus souffrant de ces déficiences présentent des lésions très précocement. Ainsi, pour les homozygotes, l'athérosclérose peut démarrer dès l'âge de 4 ans.

b. La dysbétalipoprotéinémie

La dysbétalipoprotéinémie est un désordre du métabolisme des chylomicrons et des VLDL causé par une mutation dans le gène codant pour l'apoE. Par conséquent, les particules résiduelles comme les résidus de chylomicrons et les IDL ne sont plus capables de transférer le cholestérol aux cellules. Ces particules s'accumulent alors dans le plasma et sont à l'origine de la formation de dépôts lipidiques au niveau des genoux et des coudes (xanthomes tubéreux), des plis palmaires et au niveau des artères (athéromes). Les lésions athéromateuses se développent déjà chez l'enfant et les complications cardiovasculaires se produisent avant l'âge de 50 ans.

I.1.2.Définition de l'athérosclérose

Le terme « athérome », caractérisant la pathologie athéromateuse vient du grec "athérê" qui signifie "bouillie" et consiste en un remaniement de l'intima de certaines artères, soit la couche interne, par accumulation de lipides, de glucides, de cellules du sang, de tissus adipeux et de dépôts calcaires.

Cette pathologie multifactorielle est la cause majeure de mortalité d'origine cardiovasculaire. Ainsi, elle cause près de 30% des décès à travers le monde.

L'athérosclérose affecte les artères de moyen et de gros calibre comme l'aorte, les artères coronaires, les artères cérébrales et les artères des membres inférieurs. La présence de plaques athéromateuses au sein des artères peut être à l'origine d'affections aiguës comme les cardiomyopathies ischémiques, les accidents cérébrovasculaires et l'ischémie des membres inférieurs.

L'athérosclérose est constituée, comme son nom l'indique, de lésions à deux composantes : l'athérome (ou cœur lipidique) et la sclérose (ou chape fibreuse). Les lésions se

forment de manière progressive et débutent par l'accumulation de macrophages chargés en lipides, c'est le stade de la **strie lipidique** qui peut être présent dès l'enfance. Ensuite, l'entrée de leucocytes au sein de la lésion entraîne une réponse inflammatoire, les cellules musculaires lisses de la média migrent et sont à l'origine de la formation de **la chape fibreuse**. La plaque athéromateuse constituée de la chape fibreuse et du cœur nécrotique est le stade final de la lésion. Dès lors, des complications comme une calcification de la paroi artérielle, une érosion de l'endothélium ou une rupture de la plaque peuvent survenir et entraîner la formation d'un thrombus par les plaquettes activées ; on parle alors de **lésion compliquée**.

I.1.3. Structure d'une artère saine

Le système artériel assure le transport du sang oxygéné vers les tissus en donnant naissance à un réseau de capillaires qui constituent les principaux sites d'échanges de métabolites et de gaz entre le sang et les tissus.

Les artères partagent une structure commune en trois couches (Figure 5) :

- **L'intima** est composée de l'endothélium, une assise de cellules endothéliales jointives (aplaties) reposant sur une membrane basale. Elles forment une barrière entre le sang et le tissu. Elles régulent la vasoconstriction, l'environnement thrombotique et la réponse inflammatoire. Une couche subendothéliale se situe sous l'endothélium et est constituée de tissu conjonctif ou d'élastine pour les artères de type élastique comme l'aorte.
- **La média** est une couche musculaire située sous l'intima ou la couche intermédiaire. Les cellules qui la composent sont de type musculaire lisse, elles sont fusiformes et dotées d'un cytosquelette contractile. La média est renforcée par des couches organisées de fibres élastiques dont la quantité varie en fonction du type d'artère. A l'interface avec l'intima et l'adventice, ces fibres élastiques forment les limitantes élastiques interne et externe, respectivement. Les lames d'élastine sont abondantes dans la média des artères élastiques.
- **L'adventice** est une fine couche de tissu conjonctif composé de fibroblastes, de collagène et de fibres élastiques. C'est la couche la plus externe de la paroi vasculaire. L'adventice des parois artérielles épaisses comporte en plus des petites artères, les *vasa vasorum*, destinées à la vascularisation de la paroi, et reçoit aussi des terminaisons nerveuses.

I.1.4. Rôle de l'endothélium

L'endothélium constitue une interface importante entre le sang et les tissus et est défini comme étant une barrière sélective capable d'intégrer divers signaux. En effet, les cellules endothéliales agissent comme un tissu activable sécrétant des médiateurs qui modulent les processus inflammatoires, le tonus vasculaire ou encore l'équilibre thrombotique.

I.1.4.1. Régulation du tonus vasculaire

L'endothélium assure un équilibre entre les molécules vasodilatatrices et vasoconstrictrices, soit le maintien de l'homéostasie vasculaire.

Les médiateurs responsables de la relaxation des cellules musculaires lisses de la média sont la prostacycline (PGI_2), le monoxyde d'azote (NO) et l'EDHF (*endothelium-derived hyperpolarizing factors*).

La prostacycline, issue de la cascade de l'acide arachidonique, agit sur les cellules musculaires lisses en interagissant avec son unique récepteur membranaire spécifique, le récepteur IP. Le messager secondaire libéré, l'AMPcyclique responsable de l'activation d'une kinase, permet la relaxation de la cellule musculaire et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire.

Le NO est produit par la NO synthase. La production de NO augmente avec la stimulation par les molécules vasoactives qui mènent à l'activation de la forme inducible de la NO synthase (iNOS). Le NO a un effet vasodilatateur médié par la génération de GMP cyclique (Vanhoutte, 2002).

Les substances constrictrices comprennent le thromboxane A_2 (TXA_2), l'endothéline et l'angiotensine. Le TXA_2 est issu de la cascade de l'acide arachidonique. C'est un antagoniste de la prostacycline car il est capable d'induire la contraction des cellules musculaires lisses et l'agrégation des plaquettes. L'angiotensine, en plus d'être vasoconstrictrice, augmente la production d'endothéline, un puissant vasoconstricteur (Vanhoutte, 2002).

I.1.4.2. Régulation de l'équilibre thrombotique

Les cellules endothéliales au repos favorisent un environnement antithrombotique, en inhibant l'activation des plaquettes. L'endothélium libère la prostacycline et le NO, qui en plus de leur fonction vasodilatatrice, sont de puissants agents anti-agrégants. L'endothélium exprime aussi en membrane l'enzyme EctoADPase chargée de l'hydrolyse d'un activateur des plaquettes : l'ADP (Michiels, 2003).

Lors de l'activation de l'endothélium induite par les cytokines proinflammatoires ou un stress physique, les cellules endothéliales sécrètent les facteurs favorisant l'activation plaquettaire tel le facteur d'activation des plaquettes (PAF) qui favorise l'agrégation des plaquettes. Le facteur de Von Willebrandt produit par les cellules endothéliales et le TXA_2 , produit par les plaquettes, favorisent également l'équilibre prothrombotique en favorisant l'agrégation.

L'endothélium module également la cascade de la coagulation et la fibrinolyse, impliquées dans l'équilibre thrombotique.

I.1.4.3. Régulation de la réponse inflammatoire

Les cellules endothéliales participent à la réponse inflammatoire lors d'une stimulation par des cytokines proinflammatoires tels le TNF α (*tumor necrosis factor*) ou l'interleukine 1 (IL-1). Les réponses de l'endothélium par rapport à ces stimuli sont :

- **L'amplification du signal.** Les cellules endothéliales activent la transcription de gènes codant pour des cytokines proinflammatoires.
- **L'augmentation de la perméabilité vasculaire.**
- **L'expression de facteurs de croissance** comme le M-CSF (*Macrophage-colony stimulating factor*) impliqué dans la différenciation des monocytes en macrophages.
- **L'expression des molécules d'adhérence** impliquées dans la diapédèse (Figure 6). L'endothélium activé va synthétiser une série de molécules pour permettre l'entrée des

leucocytes au sein du tissu. La première étape de la diapédèse consiste à ralentir les monocytes circulants, c'est la phase de roulement. L'endothélium synthétise les sélectines E et P qui reconnaissent leurs ligands sur le monocyte, l'interaction freine le monocyte. La deuxième phase est une adhésion ferme du monocyte à l'endothélium. Le monocyte est immobilisé par la liaison des molécules d'adhésion de la super famille des immunoglobulines, les ICAM (*intercellular cell adhesion molecule*) et VCAM (*vascular cell adhesion molecule*) avec leurs ligands, les intégrines en surface des monocytes. La dernière étape, la transmigration du monocyte nécessite la dissociation des jonctions entre cellules endothéliales pour permettre le passage du monocyte.

- **L'expression de chemokines.** Citons en exemple, la MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein*), le ligand du récepteur CCR2 présent en surface du monocyte. Cette chémokine est libérée selon un gradient de concentration afin de diriger le monocyte vers le site inflammatoire.

I.1.5. Formation des lésions athéromateuse

I.1.5.1. Initiation de la lésion athéromateuse

La lésion athéromateuse se forme de manière progressive. Les deux événements majeurs impliqués dans la genèse de la lésion sont un flux sanguin turbulent et la présence de lipoprotéines proathérogènes, les LDL, et en particulier, les LDL oxydées. L'accumulation des LDL au sein de l'intima de la paroi artérielle est la conséquence de l'augmentation du taux de LDL plasmatique. Les LDL traversent passivement l'endothélium notamment grâce à leur petite taille. Le passage des LDL se déroule dans les zones au flux sanguin perturbé où l'endothélium est plus perméable, comme dans les zones de bifurcation du réseau artériel (Gimbrone, 1999).

Dans l'intima, les LDL interagissent via leur apoB100 avec l'héparan sulfate de la matrice extracellulaire. Les LDL s'agrègent et subissent un processus d'oxydation par les hydroperoxydes et les ROS qui altèrent les lipides et l'apoB100. Le rôle des hydroperoxydes produits par la 12,15 lipooxygénase (12/15 LOX) a été mis en évidence dans un modèle *in vivo* utilisant des souris déficientes pour l'apoprotéine E (apoE^{-/-}) et déficientes pour le récepteur aux LDL natives (LDLR^{-/-}). En effet, il a été démontré que la suppression du gène codant pour la 12/15 LOX diminue la progression des lésions chez ces souris (Cyrus et al., 2001; George et al., 2001).

Les LDL oxydées jouent un rôle prépondérant dans la plupart des étapes de la formation des lésions athéromateuses. Dans l'initiation de la lésion, elles sont à l'origine de l'activation endothéliale. L'endothélium activé sécrète les facteurs vasoconstricteurs comme l'endothéline et inhibe la production de NO, un puissant vasodilatateur. Il exprime également des molécules d'adhérence ainsi que des chémokines qui permettent aux leucocytes d'entamer le processus de diapédèse (Figure 7) (Fan and Watanabe, 2003). Ce sont principalement les monocytes et les lymphocytes T qui s'accumulent dans l'intima. Les monocytes dans l'intima se différencient en macrophages sous l'influence du facteur de différenciation M-CSF sécrété par l'endothélium. Si les lymphocytes T sont moins nombreux au sein de la lésion, ils entretiennent toutefois la réponse inflammatoire par la sécrétion de cytokines proinflammatoires, comme l'interféron γ qui active les macrophages et augmente la synthèse d'IL-1 et de TNF α (Hansson, 2005).

I.1.5.2. La strie lipidique

La strie lipidique apparaît d'un point de vue macroscopique comme un dépôt jaunâtre faisant saillie dans la lumière de l'artère (Figure 8). Ce stade précoce de la lésion athéromateuse, pouvant débuter dans l'enfance, est sans symptômes et peut régresser.

C'est l'accumulation de cellules spumeuses sous l'endothélium qui est responsable de la formation de la strie lipidique. Les cellules spumeuses sont issues des macrophages de l'intima qui se chargent en lipides. Le processus de différenciation des macrophages en cellules spumeuses commence par la surexpression des récepteurs éboueurs en surface des macrophages en réponse aux cytokines proinflammatoires (Figure 7). Les récepteurs éboueurs reconnaissent essentiellement les LDL oxydées qui s'accumulent sous forme de gouttelettes lipidiques dans le macrophage et qui dès lors est appelé cellule spumeuse.

Les récepteurs éboueurs n'étant pas régulés par la concentration en cholestérol, les macrophages continuent à accumuler les lipides. Cependant, il existe un mécanisme d'efflux du cholestérol permettant le transport de ce dernier de la cellule vers le foie par les HDL. Ce mécanisme fait appel à l'apoE et à un transporteur du cholestérol en membrane cellulaire de la famille *ATP binding cassette* qui nécessite l'hydrolyse d'un ATP pour assurer son activité de transport.

I.1.5.3. La chape fibreuse

La chape fibreuse est une structure fibreuse qui confère à la lésion sa rigidité (Figure 9). Elle est composée de cellules musculaires lisses (CML) et d'éléments de la matrice extracellulaire tel que le collagène, la fibrine, l'élastine et les protéoglycans. L'événement initiateur de la chape fibreuse est la migration des CML à partir de la média de la paroi artérielle. Les cellules musculaires lisses s'accumulent dans l'intima et forment une capsule autour du centre lipidique constitué de cellules spumeuses. La libération de cytokines et de facteurs de croissance comme le PDGF (*platelet derived growth factor*) ou le FGF (*fibroblast growth factor*) par les leucocytes activés et les cellules endothéliales, constitue un signal pour la migration et la prolifération des CML. Cependant, la migration des CML nécessite aussi la destruction de la matrice extracellulaire par les enzymes métalloprotéinases libérées par les macrophages.

Dans l'intima, les CML peuvent se différencier en cellules spumeuses ou synthétiser de la matrice extracellulaire. En conditions physiologiques, les cellules musculaires lisses présentent un phénotype contractile. Lors de leur passage dans l'intima, les cellules musculaires lisses acquièrent un phénotype sécrétoire et peuvent ainsi former la chape fibreuse. En effet, la synthèse des filaments constituant le cytosquelette contractile diminue au profit de la synthèse des éléments de la matrice extracellulaire.

I.1.5.4. La plaque athéromateuse

La plaque athéromateuse (Figure 10) est composée d'un cœur nécrotique formé de lipides et de cellules mortes. Elle est entourée par la chape fibreuse bien constituée. Le cœur nécrotique est formé après la dégénérescence des cellules spumeuses qui libèrent le cholestérol, les esters de cholestérol et les phospholipides.

La stabilité de la lésion au stade de la plaque athéromateuse dépend de la composition cellulaire de la plaque. Ainsi, une proportion élevée en CML synthétisant les éléments de la matrice extracellulaire, comme le collagène, stabilise la plaque et réduit le risque d'accident

cardiovasculaire aigu. Par contre une proportion élevée en macrophages activés au sein de la plaque la rend instable. L'instabilité provient du processus inflammatoire qui augmente la sécrétion de métalloprotéinases, des enzymes responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire. Quand les cellules musculaires lisses, en proportion plus faible, ne synthétisent plus suffisamment d'éléments fibreux, la plaque est alors fragilisée. De plus les lymphocytes T de la lésion libèrent des cytokines comme l'interféron γ qui inhibe la sécrétion d'éléments fibreux par les cellules musculaires lisses (Lusis, 2000). La rupture de la plaque est à l'origine d'accidents cardiovasculaires aigus comme l'infarctus du myocarde. La perte de l'intégrité de l'endothélium est un événement menant à l'activation des plaquettes et à la formation du thrombus. Le thrombus obstrue la lumière de l'artère et le sang oxygéné ne parvient plus au tissu (Glass and Witztum, 2001).

I.1.5.5. Les complications

a. L'ulcération de l'endothélium

L'ulcération est caractérisée par une érosion de la couche endothéliale liée à des contraintes mécaniques ou à la constitution de la plaque. Le contact du sang avec les constituants de la plaque athéromateuse et la libération de substances prothrombogènes contenues dans celle-ci favorisent l'apparition de thrombose ou d'embolie. Une embolie, est due à la migration d'un caillot s'engageant dans les artères de plus en plus étroites et provoquant finalement une obstruction des vaisseaux sanguins. En effet, les plaquettes sont activées lors de la mise en contact avec la couche subendothéliale, elles changent de forme, s'étalent et sécrètent les substances proagrégantes contenues dans leurs granules. Les autres plaquettes circulantes sont activées par ces substances et finissent par s'agréger en formant des ponts moléculaires entre leurs glycoprotéines de surface.

b. La thrombose

La thrombose provient de la formation d'un thrombus qui obstrue la lumière du vaisseau sanguin (Figure 11). Le thrombus est le produit final de l'agrégation plaquettaire. La conséquence d'une thrombose est l'ischémie des tissus périphériques entraînant la nécrose du tissu.

La formation du thrombus dans l'athérosclérose est la conséquence directe d'une rupture ou d'une fissuration de l'endothélium. Un thrombus peut s'intégrer au sein d'une plaque athéromateuse, augmentant ainsi sa taille et diminuant la lumière du vaisseau sanguin. Mais, il peut également se former brutalement et obstruer la lumière artérielle ; il provoque alors un infarctus. Cet événement est généralement rencontré lorsque la plaque est instable. Finalement, le thrombus peut se détacher de la plaque, il est emporté dans la circulation, il sera alors la cause d'une embolie (Figure 12).

c. La néovascularisation

Les plaques athéromateuses rendent les parois artérielles plus épaisses. La paroi nécessite alors l'irrigation par de nouveaux vaisseaux sanguins. C'est pourquoi il survient une néovascularisation à partir des *vasa vasorum* de l'adventice. Ces nouveaux vaisseaux sanguins apporteront l'oxygène et les nutriments nécessaires aux constituants de la plaque. Ces capillaires sont cependant fragiles et, lors d'une rupture de ces vaisseaux sanguins, une hémorragie survient dans la paroi artérielle. Le sang se répand alors au sein de la plaque, formant un caillot au cœur de celle-ci.

d. La calcification

La précipitation des ions Ca^{2+} sur la matrice extracellulaire est à l'origine de la calcification de la plaque athéromateuse ; ce qui lui confère un aspect de coquille d'œuf. La calcification durcit la lésion et la rend instable. Elle augmente aussi les risques de rupture de la plaque.

I.1.6. Quelques modèles animaux

I.1.6.1. Généralités

De nombreuses espèces animales ont été utilisées pour étudier l'athérogenèse et l'effet de traitements pharmacologiques sur les lésions athéromateuses.

Le porc domestique est l'un de ces modèles. Lorsqu'il est soumis à une diète athérogène, il présente des lésions athéromateuses qui s'apparentent aux lésions humaines. Cependant, ce modèle étant difficile à manipuler, c'est pourquoi un modèle utilisant des « *mini pigs* » a été mis au point, plus facile à manipuler mais néanmoins plus coûteux (Narayanaswamy et al., 2000).

Dans les modèles proches de l'homme, le singe est également un excellent candidat. Cependant, l'utilisation de ces espèces animales engendre des coûts importants. Parmi d'autres modèles plus manipulables, le lapin est encore utilisé. Certaines espèces comme le lapin Watanabe développent une hyperlipidémie. Ce modèle a notamment été utilisé pour étudier le rôle de certains gènes dans l'athérosclérose comme le gène codant pour l'apoAI (Brousseau and Hoeg, 1999).

Par leur résistance naturelle à cette pathologie, la souris est un modèle inadapté pour l'étude de l'athérosclérose. En effet, les souris présentent un profil lipidique différent de celui de l'homme. Si le cholestérol est porté essentiellement par les HDL chez la souris, il est porté par les LDL chez l'homme. De plus, chez la souris, les VLDL sont constituées principalement d'apoB48 car la cytidine deaminase APOBEC est surtout abondante au niveau des hépatocytes, alors que chez l'homme, elle est essentiellement exprimée au niveau de l'entérocyte.

Une souche de souris s'est néanmoins révélée plus sensible à l'athérosclérose, les souris C57BL/6J soumises à un régime riche en graisse (Diète de Paigen : 15% graisses 1,25% cholestérol, 0,5% acide cholique). Mais dans ce modèle, les lésions ne dépassent pas le stade de la strie lipidique (Jawien et al., 2004). C'est pourquoi, plusieurs modèles de souris *knock-out* (KO) et transgéniques ont été développés. Les modèles les plus utilisés actuellement sont développés ci-dessous.

I.1.6.2. Le modèle de souris apoE^{-/-}

Récemment, des souris déficientes en apoE ont développé une hypercholestérolémie sévère et des lésions athéromateuses dont la composition et la distribution des lésions s'apparentent à celles observées chez l'homme. Les souris apoE^{-/-} sous un régime normal présentent une augmentation du taux de cholestérol (400 à 500 mg/dL), de triglycérides plasmatiques tandis que le taux de HDL est diminué. L'accumulation de lipoprotéines de type VLDL résiduels à ApoB48 serait à la base de la formation des lésions.

Dans ce modèle, l'athérosclérose concerne principalement l'aorte, préférentiellement au niveau du sinus aortique, aux points d'embranchement d'artères et de la bifurcation iliaque

(Figure 13). A partir de la 3^{ème} semaine, l'agrégation des LDL et leur alignement le long des fibres de collagène ont été visualisés en microscopie électronique à transmission (Tamminen et al., 1999).

Dans ce modèle murin, les lésions débutent par une augmentation de l'adhérence des monocytes à l'endothélium activé dès l'âge de 5 semaines. Les monocytes transmigrent et se différencient en macrophages qui accumulent les LDL oxydées. Les cellules spumeuses s'accumulent et forment les stries lipidiques. Les cellules musculaires lisses migrent de la média vers l'intima chez la souris âgée de 6 à 10 semaines (Nakashima et al., 1994). La maladie progresse vers la formation d'une chape fibreuse et d'un cœur nécrotique, et parfois vers une calcification de la paroi artérielle ou vers un anévrisme, une dilatation locale de la paroi des artères. Toutefois la rupture de plaque n'est jamais observée chez la souris. Ceci serait dû à une tension de surface plus élevée dans l'aorte de souris dont le diamètre est inférieur à 1mm (Jawien et al., 2004).

Lorsque ces souris sont soumises à un régime riche en graisse nommé « *western diet* » (21% de graisses et 0,15% de cholestérol), une apparition précoce de la maladie et une augmentation de la taille des lésions sont observées.

Les souris apoE^{-/-} ont permis la compréhension des mécanismes de formation des plaques athéromateuses. Ainsi, les souris KO d'autres gènes codant pour d'autres protéines ont permis de mettre en évidence le rôle de ces protéines dans la progression de l'athérosclérose (voir point 1.1.6.4).

1.1.6.3. Le modèle de souris RLDL^{-/-}

Le modèle des souris KO pour le gène du récepteur aux LDL a été développé dans l'espoir d'obtenir un phénotype d'hypercholestérolémie familiale, autrement dit une augmentation du taux de LDL. Néanmoins, chez les souris RLDL^{-/-} soumises à un régime normal, une modeste augmentation du taux de cholestérol associé aux lipoprotéines LDL et IDL est seulement observée et ces souris ne développent qu'une faible quantité de lésions athéromateuses (Breslow, 1996).

En revanche, une diète athérogène riche en graisse de type « *Paigen diet* » augmente le taux de cholestérol à 1500 mg/dL chez les souris RLDL^{-/-}. Les souris RLDL^{-/-} développent alors nettement plus de lésions athéromateuses. Toutefois, la diète de Paigen n'est pas physiologique. Lorsque les souris RLDL^{-/-} sont soumises à un régime de type occidental moins toxique (*Western type diet*), celles-ci présentent également une augmentation du cholestérol plasmatique. Les lésions des souris RLDL^{-/-} passent par le stade de la strie lipidique et le développement d'une chape fibreuse (Jawien et al., 2004).

Les lésions chez les souris RLDL^{-/-} soumises à un régime de type occidental, se développent le long de l'aorte. A l'instar du modèle apoE^{-/-}, les zones enclines à la formation des plaques athéromateuses sont la crosse aortique, l'entrée de l'artère brachiocéphalique, les carotides, les sous-clavières, les zones d'intersection avec les artères mésentériques et rénales et la bifurcation iliaque (Figure 13) (Tangirala et al., 1995).

1.1.6.4. Les modèles de souris double *knock-out*

La fonction de beaucoup de protéines dans la formation de la plaque a pu être mise en évidence par des souris doubles *knock-out*.

Le rôle de la molécule d'adhésion ICAM-1 a été investigué dans un modèle de souris déficiente en apoE et ICAM-1 (APOE^{-/-}/ICAM-1^{-/-}). La déficience en ICAM-1 diminue la

taille des lésions; ce qui confirme l'hypothèse du rôle proathérogène d'ICAM-1 (Bourdillon et al., 2000).

De même, des souris *knock-out* pour le gène codant pour le récepteur TP (TP^{-/-}) ont été étudiées. Le récepteur TP est le récepteur au TXA₂, considéré comme athérogène. Il a été démontré que des souris apoE^{-/-} croisées avec des souris déficientes en récepteur TP développent moins d'athérosclérose.

Par contre, le récepteur IP, de la prostacycline, un médiateur aux propriétés vasodilatatrices et antiagrégantes, est antiathérogène. La délétion de ce gène chez les souris apoE^{-/-} augmente les lésions athéromateuses (Kobayashi et al., 2004)

I.2. Les médiateurs issus de l'acide arachidonique impliqués dans la pathologie athérosclérose

I.2.1. Le thromboxane A₂

I.2.1.1. La cascade de l'acide arachidonique

a. L'acide arachidonique

L'acide arachidonique est un acide gras polyinsaturé constitué de 20 atomes de carbone et contenant 4 doubles liaisons. Il est le précurseur de la synthèse des eicosanoïdes reprenant les prostaglandines, les leucotriènes et des époxydes générés de manière enzymatique.

L'acide arachidonique provient des acides gras composant les phospholipides membranaires. Il est issu de l'hydrolyse par la phospholipase A₂ (PLA₂) du lien ester en position C₂ du glycérol. La PLA₂ impliquée dans la cascade de l'acide arachidonique appartient à la famille des PLA₂ cytosoliques dépendantes de la concentration en Ca²⁺ pour leur activation et la translocation vers la membrane.

L'acide arachidonique libéré devient le substrat d'enzymes de trois voies métaboliques différentes ; les lipooxygénases qui engendrent les leucotriènes, les époxygénases générant les époxydes et les cyclooxygénases responsables de la production des prostanoïdes (Figure 14).

La voie des cyclooxygénases génère le précurseur indispensable à la formation du thromboxane A₂; dont la voie enzymatique est détaillée ci-dessous.

b. La voie des cyclooxygénases

Les cyclooxygénases, nommées aussi endoperoxyde H synthétases, sont des glycoprotéines membranaires homodimériques qui catalysent la formation de l'endoperoxyde PGH₂.

La cyclooxygénase comporte deux sites catalytiques. Le site cyclooxygénase catalyse l'oxydation et la cyclisation de l'acide arachidonique par l'insertion de deux molécules d'oxygène (O₂). Le produit de la réaction est un endoperoxyde instable, la prostaglandine G₂ (PGG₂). Ensuite, le site peroxydase catalyse la réduction de la PGG₂ en prostaglandine H₂ (PGH₂) (Figure 15).

Il existe au moins deux isoformes de la cyclooxygénase : la COX-1 et la COX-2. L'isoforme 1 de la cyclooxygénase (COX-1) est exprimée de manière constitutive et produit le substrat PGH_2 préférentiellement utilisé par la thromboxane synthétase. Elle est exprimée dans la plupart des tissus. Le gène de l'isoforme 2 de la cyclooxygénase (COX-2) est sous le contrôle d'un promoteur sensible à certains facteurs de transcription comme NF- κ B, un facteur de transcription exprimé en conditions inflammatoires. La COX-2 est donc l'isoforme inductible en réponse aux stimuli inflammatoires.

L'aspirine ou acide acétylsalicylique (ASA), un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS), est un inhibiteur irréversible de la cyclooxygénase. Le groupement acétyle de l'aspirine est greffé au niveau du site actif de la cyclooxygénase (Figure 16). De ce fait, l'aspirine à faible dose inhibe la production de TXA_2 .

c. Les prostanoïdes

Les prostanoïdes sont des molécules à 20 atomes de carbone comportant un cyclopentane et deux chaînes hydrocarbonées (Figure 17). Ce sont des « hormones » dites locales, elles stimulent les cellules voisines (paracrine), ou stimulent la cellule qui les produit (autocrine) (Figure 18).

La PGE_2 ou prostaglandine E_2 module la réponse inflammatoire en inhibant par exemple la production de cytokines. Elle est notamment produite au niveau du tractus génital et provoque les contractions utérines. Elle diminue également les sécrétions gastriques et agit comme un vasodilatateur.

La $\text{PGF}_{2\alpha}$ ou prostaglandine $\text{F}_{2\alpha}$ induit la contraction des muscles lisses. Elle est produite par le cœur, la rate et le rein.

La PGD_2 ou prostaglandine D_2 est produite dans les mastocytes, elle régule la réponse inflammatoire, inhibe l'agrégation plaquettaire et est vasodilatatrice.

La PGI_2 ou prostacycline possède des propriétés vasodilatatrices et anti-agrégantes plaquettaires. Comme la PGE_2 , elle diminue les sécrétions gastriques.

Le TXA_2 ou thromboxane A_2 possède des propriétés vasoconstrictrices et proagréantes plaquettaires. C'est l'antagoniste physiologique de la prostacycline.

Les prostaglandines E_2 , $\text{F}_{2\alpha}$ et D_2 sont les produits d'isomérase. La biosynthèse du TXA_2 est catalysée par une réductase, la thromboxane synthétase, une enzyme de la famille du cytochrome P450. La prostacycline est quant à elle synthétisée par la prostacycline synthétase.

I.2.1.2. Le rôle du thromboxane A_2

Le TXA_2 agit sur les cellules en interagissant avec un récepteur qui lui est propre, le récepteur TP qui appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR).

Le TXA_2 est un effecteur puissant mais instable. Le temps de demi-vie de ce prostanoïde est très court (30 secondes) ; le TXA_2 est en effet rapidement hydrolysé en thromboxane B_2 , un métabolite inactif.

Le TXA_2 est responsable de l'activation plaquettaire, incluant un changement de forme, l'agrégation des plaquettes et la dégranulation qui conduit à la libération d'activateurs des plaquettes. Le TXA_2 induit la contraction et la prolifération des cellules musculaires lisses (Hamberg et al., 1975). Il est responsable de la vasoconstriction et de la bronchoconstriction.

Pour terminer, le TXA₂ induit l'expression de molécules d'adhérence par les cellules endothéliales (Ishizuka et al., 1994) (Figure 19).

L'antagoniste physiologique du TXA₂ est la prostacycline. Dans le système vasculaire, le TXA₂ est produit par les plaquettes tandis que la prostacycline est synthétisée au niveau de l'endothélium. L'équilibre entre la production de ces deux prostanoïdes est déterminant dans le maintien de l'homéostasie vasculaire. La production de TXA₂ par les plaquettes, déclenche la synthèse de prostacycline par les cellules endothéliales (Ullrich et al., 2001). La prostacycline inhibe l'activation des plaquettes et induit la relaxation des cellules musculaires lisses de la média (vasodilatation) (Figure 20). La prostacycline, comme son antagoniste, est reconnue par un récepteur qui lui est propre appartenant aussi à la famille des GPCR et qui active une adénylate cyclase augmentant le taux d'AMPcyclo.

I.2.1.3. Le récepteur TP

Le récepteur TP, un récepteur couplé aux protéines G, est composé de sept domaines transmembranaires. Il reconnaît le TXA₂ et l'endoperoxyde PGH₂.

Ce récepteur existe sous deux isoformes partageant les 328 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale. La forme tronquée est TP α , alors que TP β comporte une extrémité C-terminale plus longue (Figure 21). L'isoforme TP α provient d'un épissage alternatif au niveau du troisième exon de l'ARN messenger codant pour le récepteur. L'expression des deux isoformes varie en fonction du type cellulaire. Ainsi, l'isoforme TP α est exprimée majoritairement au niveau des plaquettes. La modulation de l'adénylate cyclase diffère en fonction de l'isoforme, TP α augmente la production d'AMPc tandis que TP β inhibe l'adénylate cyclase et diminue le taux d'AMPc.

La voie de transduction du signal consécutive à la liaison du ligand implique la dissociation des sous unités de la protéine G hétérotrimérique. Les différentes protéines G exprimées par les plaquettes sont les protéines G_q, G₁₂ et G_i. Le rôle de chacune d'entre elles et leurs effecteurs n'ont pas encore été véritablement défini (Huang et al., 2004). Toutefois, l'étude de souris KO pour le gène codant pour la protéine G_q a permis de démontrer l'importance de cette famille de protéine G dans l'agrégation plaquettaire induite par un agoniste du récepteur TP, le U46619 (Offermanns et al., 1997). Offermanns et ses collaborateurs ont cependant observé un changement de forme des plaquettes malgré l'absence de protéine G_q, impliquant donc un remodelage de l'actine induit par les protéines G₁₂ et G_i (Huang et al., 2004; Offermanns et al., 1997).

L'activation des plaquettes sanguines est initiée par la voie de transduction du signal impliquant la phospholipase C activée par la sous unité alpha de la protéine G_q. L'enzyme clive le phosphatidyl inositol et génère les messagers secondaires tels l'inositol triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG). L'IP₃ se fixe sur son récepteur ancré dans la membrane du réticulum endoplasmique et ouvre le canal aux ions calciques. L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire et le DAG sont à l'origine de la translocation de la protéine kinase C vers la membrane. Ainsi, la phosphorylation par la protéine kinase C aboutit à des événements comme un remodelage de l'actine (Figure 22).

I.2.1.4. Le rôle du récepteur TP dans l'athérosclérose

Depuis peu, il existe un intérêt particulier pour l'implication des récepteurs TP dans la pathologie athéromateuse.

L'activation de ces récepteurs n'est pas sensible à l'aspirine parce qu'ils reconnaissent de nombreux ligands différents du TXA₂ et agonistes du récepteur TP tels la PGH₂ et les isoprostanes dont la formation est indépendante de la cyclooxygénase (Verbeuren, 2006) .

L'activation des récepteurs TP jouerait un rôle dès l'initiation de la lésion. En effet, il a été démontré qu'un agoniste du récepteur TP était capable de stimuler l'expression des molécules d'adhérence en surface de l'endothélium (Ishizuka et al., 1998) et par conséquent, de favoriser l'adhérence des monocytes.

Kobayashi et ses collaborateurs ont également démontré qu'une déficience en récepteur TP chez les souris apoE^{-/-} diminuait l'athérogenèse. Les observations rapportées pour ce modèle de souris apoE^{-/-} et TP^{-/-} sont une diminution de la réactivité des plaquettes, une augmentation de l'expression des molécules d'adhérence au niveau des lésions et une diminution de l'adhérence des monocytes (Kobayashi et al., 2004).

I.2.2. Les isoprostanes

I.2.2.1. Formation des isoprostanes

Les isoprostanes, de type prostaglandine « like », sont majoritairement formés de manière non enzymatique.

La première étape de la biosynthèse des isoprostanes est l'attaque de ROS sur l'acide arachidonique qui donne naissance à trois radicaux arachidonyl différents. Ensuite, ces ROS réagissent directement avec l'oxygène. Les produits de cette deuxième étape sont des endoperoxydes intermédiaires isomères de la PGH₂. La réduction de ces endoperoxydes est soit totale pour générer les isoprostanes de la série F₂, ou partielle, formant les isoprostanes des séries E₂ et D₂. Ces isoprostanes sont des isomères des prostaglandines. Chaque série d'isoprostanes est constituée de 4 régioisomères et pour chaque régioisomère, il existe 8 diastéréoisomères théoriques (Figure 23).

I.2.2.2. L'isoprostane 8-*iso*-PGF_{2α}

Le 8-*iso*-PGF_{2α} est un marqueur de peroxydation lipidique *in vivo*. Les métabolites de l'isoprostane peuvent être mesurés dans le plasma et l'urine. Le dosage des isoprostanes de la série F₂ permet de rendre compte de la sévérité des stress oxydatifs dans diverses pathologies. Il existe en effet un lien étroit entre la peroxydation lipidique et l'atteinte vasculaire dans les pathologies comme l'athérosclérose (Cracowski et al., 2005).

Le 8-*iso*-PGF_{2α} exercerait son action en interagissant avec le récepteur TP. L'action de l'isoprostane est abolie par une déficience en récepteur TP (Tang et al., 2005) ou par un antagoniste du récepteur (Kumar et al., 2005). Cependant, l'existence d'un récepteur propre au 8-*iso*-PGF_{2α} n'est pas exclue. Des études sur cellules musculaires lisses de rat ont démontré que l'augmentation de la production du messenger secondaire IP₃ par le 8-*iso*-PGF_{2α} n'était que partiellement inhibée par un antagoniste du récepteur TP, le SQ-29548 (Fukunaga et al., 1993) .

I.2.2.3. Biologie vasculaire des isoprostanes

Le 8-*iso*-PGF_{2α} est un modulateur de la vasomotricité ; il induit la contraction des cellules musculaires lisses. Cet isoprostane modulerait la vasoconstriction en interagissant avec le récepteur TP. Il semblerait également capable de moduler la synthèse de thromboxane

A₂, d'endothéline et de NO (Cracowski et al., 2005). Le 8-*iso*-PGF_{2α} possède également une fonction mitogène qui favorise la prolifération des cellules musculaires lisses.

L'action du 8-*iso*-PGF_{2α} sur les plaquettes n'est pas encore clairement établie. Cependant, selon Cranshaw *et al*, le 8-*iso*-PGF_{2α} serait un agoniste partiel du TXA₂. Il inhibe l'agrégation plaquettaire après une stimulation avec un agoniste du récepteur TP, le U-46619 (Cranshaw et al., 2001).

Les isoprostanes et, en particulier, le 8-*iso*-PGF_{2α} augmenterait également l'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales. L'adhérence des monocytes induite par le 8-*iso*-PGF_{2α} peut-être inhibée par un antagoniste du récepteur TP. Cependant, le 8-*iso*-PGF_{2α} n'augmente pas l'expression des molécules d'adhérence contrairement à un agoniste du récepteur TP. Si le 8-*iso*-PGF_{2α} agit bien sur le récepteur TP, il active aussi la protéine kinase A tandis qu'un agoniste du récepteur active une protéine kinase C. L'action des deux stimulants serait donc médiée par des voies de transduction du signal différentes (Leitinger et al., 2001). Toutefois, le rôle du 8-*iso*-PGF_{2α} sur l'adhérence des monocytes reste controversé. En effet, Kumar et al. ont étudié d'autres types de cellules endothéliales qui répondent à une stimulation au 8-*iso*-PGF_{2α} par une suppression de l'adhérence des monocytes (Kumar et al., 2005).

I.2.2.4. Rôle des isoprostanes dans l'athérosclérose

Au sein des plaques athéromateuses, le taux d'isoprostanes augmente par rapport au taux présent dans les parois artérielles saines. De plus, l'hypercholestérolémie ou le tabagisme, des facteurs de risque de l'athérosclérose, sont corrélés à une augmentation de la concentration en isoprostanes. L'hypothèse de l'implication des isoprostanes F₂ dans la formation des lésions a été renforcée par l'étude d'un modèle *in vivo* de souris apoE^{-/-} traitées à la vitamine E, un antioxydant. Les auteurs ont observé une diminution du taux d'isoprostane F₂ et une diminution de la progression des lésions athéromateuses suite au traitement (Cyrus et al., 2003).

Les effets proathérogéniques de l'isoprostane ont été mis en évidence dans une étude utilisant des souris apoE^{-/-} et RLDL^{-/-}. Dans ces modèles, les isoprostanes interagissant avec le récepteur TP sont responsables d'une augmentation de la taille des lésions. Ils modulent la réponse inflammatoire et sont responsables de la synthèse accrue d'ICAM-1 et de MCP-1 solubles, des marqueurs de l'inflammation (Tang et al., 2005).

Les isoprostanes de type F₂ sont produits *in situ* au sein de la plaque athéromateuse. Ils peuvent être issus de la peroxydation des phospholipides membranaires ou encore des phospholipides contenus dans les LDL. Les isoprostanes seraient à l'origine de la dysfonction endothéliale et de l'inflammation, événements initiateurs dans la formation des lésions. Les isoprostanes sont également capables de modifier la fonction plaquettaire ou la tonicité vasculaire (Figure 24) (Patrono and FitzGerald, 1997).

I.2.3. Les modulateurs de la voie du thromboxane A₂

I.2.3.1. Les inhibiteurs de la thromboxane synthétase

Les inhibiteurs de la thromboxane synthétase (TXSI) diminuent la biosynthèse de TXA₂, le ligand du récepteur TP. Ces inhibiteurs ont comme avantage, par rapport aux inhibiteurs des cyclooxygénases, de ne pas affecter la production des autres prostanoides

favorables comme la PGI₂ et la PGE₂. Parmi les TXSI, on peut citer les dérivés de l'imidazole (dazoxiben et ozagrel) ou les dérivés de la pyridine (isbogrel et furegrelate) (Figure 25).

Les essais cliniques pour les TXSI se sont avérés décevants. Le TXA₂ n'étant pas le seul ligand du récepteur TP, il semblerait que l'accumulation de PGH₂ également reconnu par le récepteur TP, soit à l'origine du manque d'efficacité de ces inhibiteurs (Dogné et al., 2000).

L'utilisation du furegrelate dans un modèle de thrombose coronarienne confirme cette hypothèse où le TXSI seul diminue bien la concentration en TXA₂ mais ne suffit pas à prévenir la thrombose. Néanmoins, l'utilisation combinée avec un antagoniste du récepteur TP se révèle nettement plus efficace (Fitzgerald et al., 1988).

I.2.3.2. Les agonistes du récepteur TP

Le TXA₂ est un composé instable présentant un temps de demi-vie court. C'est pourquoi, des agonistes plus stables du récepteur TP ont été développés. Le U-46619 (Figure 26) est l'agoniste dont la structure s'apparente le plus à celle du TXA₂. Bien qu'il ne constitue pas un outil thérapeutique, ses propriétés en font un agent couramment utilisé dans les études pharmacologiques impliquant le récepteur TP.

I.2.3.3. Les antagonistes du récepteur TP

Les antagonistes du récepteur TP visent à supprimer les effets délétères du TXA₂, de la prostaglandine H₂ et du 8-*iso*-PGF_{2α} sur les plaquettes, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales. Ils constituent donc des candidats très prometteurs sur le plan thérapeutique.

Les antagonistes peuvent être de type prostanoïde ; ce sont des structures proches des ligands naturels du récepteur TP. L'antagoniste le mieux connu de cette classe est le SQ-29548 (Figure 26). Malheureusement, il s'est révélé être un mauvais candidat pour le traitement des maladies cardiovasculaires puisqu'il possède des propriétés mutagènes. Le SQ-29548 reste néanmoins un antagoniste réversible et hautement spécifique fréquemment utilisé dans l'étude de l'activité de liaison du récepteur (Dogné et al., 2000). Le SQ-29548 est considéré comme l'antagoniste de référence ; la forme tritiée du SQ-29548 est utilisée en pharmacologie, dans le cadre d'étude de cinétique et de spécificité de liaison au récepteur. (Hedberg et al., 1988).

Le premier antagoniste de structure « non prostanoïde » développé fut le sulotroban. D'autres antagonistes ont ensuite été synthétisés comme le daltroban, le ramatroban (Figure 27) ou le térutroban (Figure 28).

Le térutroban ou S-18886, est un antagoniste prometteur du récepteur TP qui est actuellement en phase clinique III. Le térutroban se lie de manière spécifique aux récepteurs TP plaquettaires et inhibe ainsi l'agrégation. Il possède également des effets anti-vasoconstricteurs. Le térutroban administré à des patients coronariens déjà traités à l'aspirine améliore également la fonction endothéliale (Verbeuren, 2006). Sur un modèle de souris apoE^{-/-}, une étude a montré que le térutroban, contrairement à l'aspirine, réduit la progression de l'athérosclérose et diminue la concentration en ICAM-1 soluble (Cayatte et al., 2000).

I.2.3.4. Les agents mixtes

La combinaison d'un inhibiteur de la thromboxane synthase et d'un antagoniste du récepteur TP permet d'optimiser l'activité vis-à-vis du TXA₂. L'inhibiteur de la

thromboxane synthétase favorise la synthèse de prostacycline et l'antagoniste du récepteur est quant à lui destiné à pallier les effets de l'agoniste PGH_2 et du 8-*iso*- $\text{PGF}_{2\alpha}$

Le ridogrel (Figure 29), un dérivé pyridinique, est l'un de ces agents mixtes. Il inhibe non seulement l'agrégation plaquettaire induite le U-46619 mais diminue aussi la concentration en TXA_2 . Cependant l'efficacité du ridogrel en tant qu'antagoniste reste faible. Le terbogrel (Figure 29), dérivé de l'isbogrel, possède une double activité mieux équilibrée; c'est un antagoniste plus efficace que le ridogrel.

I.2.3.5. Vers de nouvelles molécules

Le torasémide, une sulfonylurée pyridinique, est un diurétique puissant qui agit en inhibant l'échangeur Na^+ , $\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ présent au niveau de la branche ascendante de l'anse de Henlé. En 1992, une étude a montré que cette molécule était capable de relaxer une artère coronaire de chien précontractée par le TXA_2 carbocyclique (Uchida et al., 1992).

Suite à cette découverte, de nombreuses sulfonylurées nitrobenzéniques apparentées au torasémide ont été synthétisées afin d'obtenir des antagonistes du récepteur du TXA_2 plus puissants (Masereel et al., 1999; Dogné et al., 2003; Dogné et al., 2001)

Parmi les activités pharmacologiques mises en évidence pour ces dérivés, plusieurs se sont montrés particulièrement actifs vis-à-vis des récepteurs au TXA_2 et sur la thromboxane synthétase. Bien qu'ayant une structure chimique originale et très différente des antagonistes de référence décrits dans la littérature, il a été démontré que ces composés ont une activité pharmacologique *in vitro* et *ex vivo* proche de certains d'entre eux.

Ainsi, les molécules BM-531, BM-567 et BM-573 (Figure 30) se caractérisent par une excellente affinité pour les récepteurs du TXA_2 plaquettaires humains, par une activité anti-agrégante plaquettaire et myorelaxante de l'aorte de rat contractée au préalable par le U-46619 (Dogné et al., 2003; Dogné et al., 2001; Rolin et al., 2001). De plus, ces molécules sont capables de réduire la production plaquettaire de TXA_2 . Le BM-520 (Figure 30), un isomère du BM-573, est également capable de relaxer l'aorte de rat préalablement contractée avec le 8-*iso*- $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Rolin et al., 2007, in press).

Une étude pharmacologique *in vivo* des propriétés antithrombotiques du BM-573 a été réalisée chez le porc dans un modèle d'infarctus du myocarde induit. Dans le groupe traité avec le BM-573 (10 mg/kg/h), ce composé s'est avéré prévenir partiellement un infarctus du myocarde induit par l'application topique d'une solution de chlorure ferrique (50%) sur l'artère interventriculaire antérieure (IVA). Ceci s'est traduit par une diminution légère du débit coronaire sans occlusion et par la prévention de l'augmentation de la synthèse de TXA_2 . Le taux sérique d'enzymes cardiaques CPK et troponine n'était pas augmenté lorsque le BM-573 avait été administré préalablement. Les études biochimiques, histopathologiques et macroscopiques du ventricule gauche ont confirmé l'effet protecteur du BM-573 dans ce modèle (Rolin et al., 2003).

Ainsi, ces travaux préliminaires ont permis de mettre en évidence une activité antagoniste importante de composés originaux, dérivés du torasémide, vis-à-vis du TXA_2 et du 8-*iso*- $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans divers modèles pharmacologiques *in vitro* et *in vivo*.

I.3. Objectifs

L'athérosclérose représente la cause majeure des maladies vasculaires et de leurs complications cliniques telles l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral. Les traitements actuels de cette pathologie consistent à en maîtriser les facteurs de risque, dont l'un des principaux est le taux plasmatique élevé en cholestérol. Les médicaments les plus efficaces contre l'athérosclérose sont des hypocholestérolémiants et appartiennent à la classe des statines. Toutefois, la diminution de la mortalité due aux maladies cardiovasculaires n'est observée que chez un tiers des patients sous statine. De nouveaux produits, susceptibles de diminuer la cholestérolémie ou de ralentir la formation des lésions au niveau de la paroi vasculaire en agissant sur d'autres cibles sont très attendus. D'autant que dernièrement, les essais cliniques du torcetrapib (développé par la firme Pfizer), capable d'augmenter les taux de HDL, ont été interrompus en raison d'une augmentation de la mortalité et des accidents cardiovasculaires lorsque les patients prenaient aussi une statine.

Ainsi, le thromboxane A_2 (TXA₂) et la 8-*iso*-prostaglandine F_{2α} (8-*iso*-PGF_{2α}) constituent de nouvelles cibles thérapeutiques attractives pour prévenir, voire neutraliser le développement des lésions athéromateuses. En effet, plusieurs études ont démontré les rôles importants joués par ces médiateurs tant dans les étapes précoces d'athérogenèse par leurs propriétés pro-inflammatoires que dans l'installation et la complication des lésions athéromateuses en raison de leurs propriétés biologiques telles un effet stimulant de l'agrégation plaquettaire, l'induction de la vasoconstriction et la stimulation de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires. Ainsi, des molécules capables de bloquer les actions délétères de ces médiateurs constituent des candidats très prometteurs sur le plan thérapeutique. Parmi ceux-ci, le térotroban, un antagoniste du récepteur TP, actuellement en étude clinique de phase III, a clairement montré un effet anti-athéromateux en améliorant la fonction endothéliale, en diminuant les taux de molécules d'adhérence et en inhibant l'activation et l'agrégation plaquettaire (Verbeuren, 2006).

Le présent mémoire a différents objectifs : d'une part d'étudier, *in vitro* les effets du TXA₂ et de l'isoprostane 8-*iso*-PGF_{2α} sur cellules endothéliales et d'autre part, d'étudier *in vivo*, l'implication du TXA₂ sur l'athérogenèse dans un modèle murin d'athérosclérose.

Les cellules endothéliales utilisées dans l'étude *in vitro* sont les cellules EAhy926, une lignée cellulaire. Cette étude nous permettra d'investiguer le rôle du TXA₂, du 8-*iso*-PGF_{2α} ainsi que le rôle de modulateurs de la voie du TXA₂ sur l'expression de la chémokine MCP-1 et de molécules d'adhérence telle ICAM-1, toutes deux impliquées dans l'athérogenèse. Ces expériences ont pour objectif d'évaluer l'impact de ces modulateurs sur les processus inflammatoires à l'origine de l'initiation de la lésion athéromateuse.

L'effet de modulateurs de la voie du TXA₂ sera aussi investigué *in vivo* dans un modèle murin d'athérosclérose utilisant des souris apoE^{-/-}. Ces souris *knock out* pour le gène codant pour l'apoprotéine E développent une athérosclérose précoce au niveau de l'aorte lorsqu'elles sont soumises à un régime normal. L'objectif de l'étude de ce modèle murin d'athérosclérose vise à démontrer l'effet protecteur de modulateurs de la voie du TXA₂ sur la progression des lésions athéromateuses. Ainsi, dans cette étude, les souris apoE^{-/-} sont soumises à un traitement médicamenteux (aspirine, BM-573 ou association de ces deux composés) dès l'âge de 6 semaines jusqu'à l'âge de 15 semaines. A 15 semaines, des prélèvements sanguins sont effectués sur chaque souris afin d'effectuer les dosages plasmatiques du cholestérol (LDL, HDL) et des triglycérides, du métabolite du TXA₂ (TXB₂), ainsi que d'ICAM-1 et de MCP-1 solubles. Un examen macroscopique et histologique mettant en évidence les lésions athéromateuses sont aussi réalisés.

Au cours de ces différentes études utilisant des cellules endothéliales et des souris apoE^{-/-}, des modulateurs du TXA₂ sont utilisés comme outils pharmacologiques. Parmi ceux-ci, un antagoniste de référence du récepteur TP, le SQ-29548 (Ishizuka et al., 2000) est utilisé dans le modèle *in-vitro* afin de comparer l'activité d'un antagoniste original développé par le Service de Chimie Pharmaceutique de l'ULg en collaboration avec le Département de Pharmacie. *In vivo*, des souris apoE^{-/-} sont traitées *per os* à l'aspirine, un inhibiteur non sélectif des cyclooxygénases capable de diminuer la production de thromboxane A₂. Les effets de l'aspirine sont comparés au BM-573 qui, en plus de sa propriété antagoniste du récepteur TP, est également un inhibiteur de la thromboxane synthétase. Enfin, l'effet synergique de ces deux composés est également investigué.

En conclusion, le modèle étudié *in vitro* a pour objectif de démontrer les capacités du BM-573 à « tempérer » les processus inflammatoires par la diminution de l'expression des molécules d'adhérence et de chémokines. Ensuite, l'étude d'un modèle *in vivo* vise à évaluer l'impact d'un traitement à l'aspirine sur la progression des lésions athéromateuses. Les effets de l'aspirine sont investigués en comparaison au BM-573 qui réduit la production de thromboxane A₂ mais prévient également par sa propriété d'antagoniste du récepteur TP, les effets des agonistes différents du thromboxane A₂ tels la PGH₂ ou les isoprostanes. En effet l'aspirine n'influence pas la production des isoprostanes formés par peroxydation de l'acide arachidonique.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1. Manipulation *in vitro*

II.1.1. Culture cellulaire

II.1.1.1. Lignée cellulaire

Les cellules utilisées sont les EAhy926, une lignée cellulaire issue de la fusion entre des cellules endothéliales de veines de cordons ombilicaux humains (HUVECS) et de cellules immortelles issues d'un carcinome de poumon (A549). Ces cellules gracieusement fournies par le Docteur Cora-Jean Edgell (Université de Caroline du Nord) à l'URBC nous ont été aimablement fournies par le Docteur Carine Michiels (URBC).

II.1.1.2. Culture des cellules

a. Matériel

- Milieu de culture 3T3-L1 : milieu DMEM (Gibco, UK) + 1,5 g/L NaHCO₃
- Sérum de veau fœtal (Gibco, UK)
- Trypsine-EDTA (Gibco, UK)
- Tampon de rinçage : PBS (*Phosphate Buffer Saline*) (Gibco, UK)
- Boîte de culture stérile de 75 cm² (T75) (Cell Star, Greiner Bio-one, Allemagne)
- Plaque 24 puits stérile (Falcon, Becton Dickinson, France)
- Tubes de 10 mL
- Pipettes stériles (2, 5, 10, 25 mL) (Sarstedt, Allemagne)
- Incubateur à 37°C (5% de CO₂) (Thermo Electron Corporation, USA)
- Centrifugeuse (Hettich, Allemagne)
- Hotte à flux laminaire Gelaire (ICN, USA)

b. Méthode

Les cellules sont cultivées à 37°C et dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ (Cambrex, Belgique) dans du milieu DMEM (Gibco, UK) enrichi avec 10 % de FBS (*Fetal Bovine serum*, Gibco, UK) et 1,5 g/L NaHCO₃.

Selon la nécessité les cellules sont cultivées dans des boîtes de 75 cm², dans des plaques 24 puits ou encore sur des lames couvre objets, lorsqu'elles sont destinées à des expériences d'immunomarquage. Le milieu est renouvelé tous les 3 jours.

Le protocole de culture cellulaire se déroule comme suit en conditions stériles et lorsque les cellules sont confluentes. Le milieu de culture est éliminé et les cellules sont rincées avec 3 mL de PBS. Ensuite 2 mL de trypsine-EDTA sont déposés dans la boîte pendant deux minutes. Lorsque les cellules sont détachées, la trypsine est neutralisée par l'ajout de 5 mL de milieu complet (milieu 3T3-L1 + 10 % de sérum de veau fœtal). Pour éliminer la trypsine et l'EDTA, la suspension de cellules est centrifugée 4 minutes à 180 g. Le culot est ensuite remis en suspension dans 4 mL de milieu complet et redistribué dans de

nouvelles boîtes T75. Les boîtes sont déposées dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. Le sérum permet la stimulation de la prolifération cellulaire.

Lors du dosage de MCP-1 ou de l'immunofluorescence, les cellules sont repiquées à une densité de 50 000 cellules (immunofluorescence) et 100 000 cellules (dosage de MCP-1) par puits sur plaque 24 puits.

II.1.2. Stimulation des cellules

II.1.2.1. Les médiateurs

- Le **TNF α** (R&D system, Allemagne), reconstitué dans du PBS (*Phosphate Buffer Saline*) contenant 0,1 % de BSA (*Bovine serum albumin*) est conservé à -70°C. Le TNF α , concentré à 10 μ g/mL, est dilué dans du milieu de culture sans sérum et utilisé aux concentrations de 1, 5, 10 et 50 ng/mL.
- Le **U-46619** (Cayman Chemical, USA), agoniste du récepteur TP, est reconstitué dans du DMSO (Sigma) et conservé à -20°C. Il est à une concentration initiale de 30 mM et utilisé aux concentrations 0,1, 1, 10 et 30 μ M.
- Le **8-iso-PGF_{2 α}** (Cayman Chemical, USA) est également reconstitué dans du DMSO (Sigma) et conservé à -20°C. La concentration initiale en 8-iso-PGF_{2 α} est de 20 mM. Il est dilué dans le milieu sans sérum aux concentrations finales de 0,1 ; 1 ; 10 et 30 μ M.
- Le **SQ-29548** (Cayman Chemical, USA), antagoniste du récepteur TP, est reconstitué dans du DMSO (Sigma) à une concentration initiale de 2 mM et testé aux concentrations de 0,02 ; 0,2 et 2 μ M.
- Le **BM-573**, antagoniste du récepteur TP et inhibiteur de la thromboxane synthase, est testé aux mêmes concentrations que le SQ-29548 et reconstitué dans le DMSO pour une concentration de 2 mM et est testé aux concentrations de 0,1 ; 1 et 10 μ M.
- Le **BAY 11-7082**, inhibiteur de l'activation de NF- κ B est solubilisé dans le DMSO à 50 mM. Il est utilisé aux concentrations de 10 et 20 μ M.

II.1.2.2. Méthode

Le milieu complet est éliminé et les cellules ont été rincées avec du PBS préchauffé à 37°C. Le milieu de stimulation sans sérum (1 mL) est ensuite déposé dans les puits. Les temps d'incubation avec le TNF α , le U-46619 ainsi qu'avec le 8-iso-PGF_{2 α} sont de 4, 6, 15 et 24 h. Lorsque l'effet d'un inhibiteur est étudié, celui-ci (BM-573, SQ-29548 ou BAY 11-7082) est déposé dans les puits 1 h avant la stimulation par les médiateurs cités ci-dessus.

II.1.3. Dosage du MCP-1

II.1.3.1. Principe

La MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein*) est une chémokine libérée par les cellules en conditions proinflammatoires. La concentration de MCP-1 a été déterminée à l'aide d'un kit de dosage, où la chémokine est isolée et détectée par un système de reconnaissance immunologique. Ensuite le dosage des protéines par le réactif de Folin a permis d'exprimer la quantité de MCP-1 par microgramme de protéine et de comparer les échantillons entre eux.

II.1.3.2. Dosage des protéines au Folin

a. Principe

Le dosage des protéines par le réactif de Folin se déroule en trois étapes. Dans un premier temps, les ions Cu^{2+} réagissent en milieu alcalin avec les atomes d'azote formant les liaisons peptidiques et forment un complexe. Les ions Cu^{2+} sont par la suite réduits en Cu^+ en présence du tryptophane, de la tyrosine, de la cystéine et de l'histidine. Les ions Cu^+ réduits permettent la dernière étape de la réaction, la réduction du réactif de Folin en un composé coloré en bleu qui peut être dosé en colorimétrie (Figure 1).

b. Matériel

- NaOH 0,5N
- NaOH 1N
- Solution A (Tableau 1)
- Réactif de Folin dilué 2 fois par de l'eau (Merck, Allemagne)
- Etalon BSA (*Bovine Serum Albumin*) concentré à 1000, 500, 200 et 100 µg/mL

c. Méthode

Les cellules sont lysées avec 150 µL de NaOH 0,5N durant 30 min, les lysats cellulaires sont récupérés et peuvent être congelés à -20°C . Dans chaque tube, 150 µL d'échantillon ont été déposés et additionné d'1 mL de la solution A. Après 15 min d'incubation, 100 µL de réactif de Folin sont ajoutés à chaque tube. Après 30 min d'incubation, l'absorbance de l'échantillon est lue à 740 nm au spectrophotomètre.

L'étalon BSA est dilué 2 fois par du NaOH 1N et les concentrations finales de l'étalon sont de 500, 250, 100, 50 µg/mL. La valeur d'absorbance à une longueur d'onde de 740 nm associée à chaque concentration en BSA permet d'établir la droite d'étalonnage. L'équation de cette droite permet de calculer la concentration en protéine dans chaque échantillon.

II.1.3.3. Dosage du MCP-1

a. Principe

Le dosage du MCP-1 se déroule selon le protocole fournit par la firme allemande *R&D system* à l'aide du kit *Quantikine Human CCL2/MCP-1*.

Le dosage de MCP-1 se base sur la reconnaissance immunologique d'un anticorps pour la protéine. Les plaques 96 puits sont en effet recouvertes d'un anticorps qui reconnaît la MCP-1, il permet ainsi d'isoler la protéine de l'échantillon dans chaque puits.

Un deuxième anticorps couplé à la peroxydase de raifort (HRP, *horse radish peroxidase*) reconnaît également la chemokine immobilisée par le premier anticorps. L'enzyme HRP détruit le peroxyde d'hydrogène en oxydant une molécule chromogène ; ce qui génère un produit coloré dont l'abondance est proportionnelle à la quantité de MCP-1 détectée (Figure 2).

b. Matériel

- Kit de dosage MCP-1, Quantikine Human CCL2/MCP-1 (R&D system, Allemagne)
- Lecteur de plaque mesurant l'absorbance à 450 nm (Thermo Electron Corporation, USA)

c. Méthode

Les cellules sont repiquées à une densité de 10^5 cellules par puits dans les plaques 24 puits. Elles sont stimulées 24 h plus tard durant un temps déterminé avec les molécules étudiées. Ensuite, le milieu de culture est récolté et centrifugé 2 min à 6081 g pour éliminer les éventuelles cellules en suspension. Le surnageant est récolté et conservé à -70°C . Ensuite, 200 μL d'échantillon sont déposés dans chaque puits selon le protocole fourni par la firme.

II.1.4. Immunofluorescence

II.1.4.1. Principe

L'immunofluorescence est une technique permettant de visualiser la localisation d'une protéine au sein d'une cellule. Le principe de l'immunofluorescence se base sur la reconnaissance de la protéine par un anticorps primaire dirigé spécifiquement contre celle-ci. Par la suite, un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome reconnaît l'anticorps primaire. Les cellules sont visualisées en microscopie confocale à fluorescence, le fluorochrome est excité et réémet de la fluorescence à une longueur d'onde précise indiquant ainsi la localisation de la protéine (Figure 3). Le noyau des cellules peut également être marqué par un agent intercalant tel le To-pro-3 qui en s'intercalant entre les doubles brins de l'ADN émet de la fluorescence.

II.1.4.2. Matériel

- Plaque 24 puits (Falcon, Becton Dickinson, France)
- Lamelles couvre-objet de 13mm de diamètre (VWR, Belgique)
- Lames porte-objet 2,6 x 7,6 cm (VWR, Belgique)
- PBS (*Phosphate Buffer Saline*) (tableau 2)
- PBS + Paraformaldéhyde (PFA) 4% préchauffé à 37°C (Tableau 2)
- PBS + TritonX100 1% (Tableau 2)
- PBS + BSA (*Bovine serum albumin*) 2% (Tableau 2)
- Anticorps primaire : Anticorps monoclonal de souris dirigée contre ICAM-1 dilué 100x (R&D system, Allemagne)
- Anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps de souris et couplé à l'Alexa fluor 488, dilué 500x (Molecular Probe, USA)
- To-Pro 3 (Molecular Probe, USA) dilué 80 fois dans une solution de PBS + RNase 2mg/mL
- Milieu de montage : Mowiol (Sigma-Aldrich, Allemagne, UK)

II.1.4.3. Méthode

Le milieu des cellules est retiré à la pipette pasteur et 400 μL de fixateur (PBS/PFA 4%) ont été déposés dans chaque puits durant 10min. Les cellules sont ensuite rincées trois fois au PBS durant 1 min. Par après 400 μL de PBS + Triton X100 1% sont ajoutés durant 5

minutes permettant la perméabilisation des cellules. Un second rinçage est alors réalisé trois fois en présence de PBS/BSA 2% durant 5min.

Une goutte d'anticorps primaire (30 μ L) est déposée sur le parafilm en chambre humide, les lamelles couvre-objets ont ensuite été retournées sur cette même goutte pour une incubation de 2 heures à température ambiante. Les cellules sont enfin rincées trois fois durant 1 min avec du PBS/BSA 2%.

L'incubation avec l'anticorps secondaire s'est déroulée selon le même procédé excepté qu'elle a duré 1 heure. Cependant les cellules sont protégées de la lumière afin d'éviter l'excitation du fluorochrome.

Le marquage des noyaux au To-Pro 3 a nécessité 30 min d'incubation et est réalisé en renversant les couvre-objets sur une goutte de 30 μ L de To-Pro 3 dilué 80x.

Pour terminer, après trois rinçages des cellules au PBS, les lamelles couvre-objets ont finalement été montées sur une goutte de milieu de montage (Mowiol) et déposée sur une lame porte-objet. Les lames ont été conservées à 4°C dans l'obscurité jusqu'à l'observation au microscope.

II.1.5. Western blot

II.1.5.1. Lysats cellulaires

a. Matériel

- Tampon de lyse (tableau 3)
- Racloir

b. Méthode

Les cellules ont été repiquées dans des boîtes de culture de 25 cm² (T25) à raison de 1x10⁶ cellules par boîte.

Pour la lyse cellulaire, le milieu a été décanté et les T25 sont déposées sur de la glace. Ensuite, 150 μ L de tampon de lyse sont déposés dans chaque boîte et les cellules sont racloées vers le fond de celle-ci. Le lysat est récolté dans un *eppendorf* refroidi et centrifugé à 4°C durant 5 min à 17949 g. Le surnageant est récupéré, aliquoté et conservé à -70°C.

Pour le contrôle positif, un lysat de plaquettes humaines est préparé. Les plaquettes sont obtenues à partir d'un prélèvement sanguin.

Le prélèvement contenu dans des tubes citratés est centrifugé dans un premier temps à 90 g durant 10 minutes pour obtenir le plasma riche en plaquette (PRP). Une seconde centrifugation est réalisée à 180 g durant 10 minutes pour l'obtention du plasma pauvre en plaquette (PPP). Le PRP est récolté et centrifugé à 4500 g afin de récupérer les plaquettes dans le culot. Le culot est ensuite été resuspendu dans 150 μ L de tampon de lyse. Une nouvelle centrifugation à 17949 g durant 5 min à 4°C a permis d'éliminer les résidus de membranes. Les aliquots sont conservés à -70°C.

II.1.5.2. Dosage de Bradford

a. Principe

Afin de normaliser les résultats de toutes les expériences, la concentration en protéines des différents lysats est mesurée. La concentration en protéine des extraits totaux est déterminée par un dosage colorimétrique basé sur la méthode de Bradford à l'aide du réactif *Bio – Rad Protein Assay* (Bio- Rad ,USA). La méthode de Bradford, permet de quantifier l'abondance en protéine dans un échantillon. Le Bleu de Coomassie est un colorant qui se fixe sur les résidus hydrophobes des acides aminés, lorsque le colorant est complexé, il change de densité optique. L'absorbance mesurée est alors proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon.

b. Matériel

- Colorant de Bradford dilué 5 fois et filtré : colorant Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, USA)
- Etalon BSA 1mg/mL

c. Méthode

Chaque tube, pour le dosage de Bradford, contient 1 mL de colorant. Ensuite, 5 µL d'échantillon sont ajoutés. Le blanc pour les échantillons est le tampon de lyse. Pour l'étalon BSA et l'eau qui constitue le blanc de l'étalon ; 3,7 µL sont déposés dans chaque tube. Après 5 minutes, l'absorbance des échantillons est mesurée à une longueur d'onde de 595 nm à l'aide d'un spectromètre pour plaques 96 puits (Multiskan MS, Labsystems, Finlande). Les mesures sont rapportées à une droite standard réalisée à l'aide de *Bovin Serum Albumin* (BSA) (Sigma, USA). La valeur d'absorbance de l'étalon de concentration connue permet le calcul de la quantité de protéine dans l'échantillon (Figure 4).

II.1.5.3. Electrophorèse

a. Principe

L'électrophorèse permet la séparation des protéines de l'échantillon en fonction de leur poids moléculaire. Dans ce but les échantillons sont chargés sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS, un détergent anionique. Les protéines dénaturées sont chargées négativement et migrent à travers les mailles du gel sous l'impulsion d'un courant électrique.

b. Matériel

- Gel : Nu-page 10% Bis-Tris Gel 10 puits (Invitrogen, USA)
- Tampon de migration (Invitrogen, USA) (Tableau 5)
- Cuve d'électrophorèse (Invitrogen, USA)
- Générateur (BioRad, USA)
- Etalon de poids moléculaire : See Blue Plus 7µL (Invitrogen, USA)
- Tampon d'échantillon bleu (Invitrogen, USA) (Tableau 5)

c. Méthode

Le gel NuPage est rincé avec la solution 2 (tableau 5) du tampon de migration avant d'être déposé dans la cuve d'électrophorèse. Les 30 µL d'échantillon contenant la même quantité de protéines et les 7 µL d'étalon sont chargés dans les puits. Le tampon de migration est déversé dans la cuve, la solution 2 au centre de la cuve et la solution 1 (tableau 5) sur les

pourtours de la cuve. Lorsque le gel est prêt, la migration est lancée en imposant un courant électrique de 200 V et une intensité de 150 mA durant 50 minutes.

II.1.5.4. Révélation

a. Principe

Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (*Polyvinylidene Difluoroïde*). Les protéines sur la membrane sont dès lors accessibles aux anticorps reconnaissant la protéine d'intérêt. Le fragment FC de l'anticorps primaire est ensuite reconnu par l'anticorps secondaire couplé à la HRP. Lorsque le substrat de la peroxydase, le luminol, est amené, la réaction entraîne la production de lumière qui est détectée par un film photographique.

b. Matériel

Transfert

- Tampon de transfert (Invitrogen, USA) (Tableau 5)
- Membrane PVDF (Amersham, UK)
- Papier Whatman (Merck, Allemagne)
- Éponge
- Appareil de transfert (Amersham, USA)

Marquage

- Tampon de rinçage TBS-T (Tableau 5)
- Solution de *blocking* (Tableau 5)
- Anticorps primaire : Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le récepteur TP dilué 5000 fois (Cayman Chemical, USA) et anticorps monoclonal de souris dirigé contre la tubuline α dilué 40 000 fois pour le contrôle de charge (Sigma-Aldrich, Allemagne, UK)
- Anticorps secondaire : Anticorps dirigé contre l'immunoglobuline de lapin et couplé la HRP dilué 100 000 fois et anticorps dirigé contre l'immunoglobuline de souris dilué 2000 fois pour le contrôle de charge (Amersham, UK).
- Solution de révélation *ECL advance western blotting detection kit* (Amersham, UK)
- Film photographique (Amersham, UK)
- Solution de révélation et de fixation du film photographique (Ilford 2000 RT Imaging, USA)

c. Méthode

Transfert

Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de *Polyvinylidene Difluoroïde* (PVDF Western Blotting Membranes : Amersham USA) pendant 2 heures 30 à 60 mA dans du tampon de transfert. Cette membrane est préalablement équilibrée par une immersion dans un bain de méthanol durant 1 minute puis dans le tampon de transfert durant 5 à 15 min. Ce transfert des protéines sur la membrane nécessite un montage avec la membrane, le gel, les papiers Whatman et les éponges comme indiqué figure 5.

Marquage

Les sites de liaisons non spécifiques de l'anticorps sur la membrane sont saturés par l'incubation de la membrane dans la solution de *blocking* pendant 2 heures sur rouleaux. Ensuite la membrane est incubée 2 heures à température ambiante avec l'anticorps primaire dilué 5000 fois dans le tampon de *blocking*. Afin d'éliminer l'excès d'anticorps, la membrane est ensuite lavée trois fois pendant 15 minutes dans du TBS-T et incubée pendant une heure, sous agitation, dans une solution contenant l'anticorps secondaire à couplé à la HRP à température ambiante.

Après trois nouveaux rinçages de 5 minutes, la membrane a été révélée par chimioluminescence en utilisant le kit ECLTM (Western Blotting Detection Reagents, Amersham, Royaume Unis). Pour la révélation, le substrat de la peroxydase est déposé durant 5 min, la membrane est ensuite déposée entre deux films transparents dans une cassette pour la protéger de la lumière. Le film photographique est déposé au dessus de la membrane en chambre noire durant un temps d'exposition déterminé. Le film photographique est ensuite plongé dans le bain de révélation jusqu'à l'apparition des bandes noires, puis dans le bain fixateur. Finalement le film est rincé abondamment à l'eau de distribution.

Lors du contrôle de charge, l'anticorps primaire dirigé contre la tubuline α ainsi que l'anticorps secondaire dirigé contre l'immunoglobuline de souris incubent 20 min avec la membrane. Chaque incubation est suivie de 3 rinçages d'une durée de 7 min.

II.2. Manipulation *in vivo*

II.2.1. Traitement des souris apoE^{-/-}

Les souris apoE^{-/-} proviennent de la firme « Charles River Laboratories ». Toutes les expériences sur les animaux ont été effectuées conformément aux normes établies par le comité d'éthique pour la protection des animaux de l'Université de Liège.

Dès l'âge de 6 semaines les souris reçoivent la drogue *per os*, dans l'eau de boisson. L'aspirine est administrée à une concentration de 100 mg/L et le BM-573 à une concentration de 10 mg/L. Le traitement est renouvelé tous les jours et sachant que les souris boivent entre 3 ou 4 mL par jour, la prise quotidienne est évaluée à 30-40 μ g de BM-573 et de 300-400 μ g d'aspirine par animal. Les souris pesant en moyenne 15 g au début du traitement, la posologie sera de 2-2,6 mg/kg pour le BM-573 et de 20-26 mg/kg pour l'aspirine, administré tous les jours. Les animaux sont répartis dans deux groupes expérimentaux de 5 animaux ; le premier groupe est traité à l'aspirine et le second à l'aspirine combinée au BM-573. Dès l'âge de 15 semaines, quatre souris sont sacrifiées pour l'examen macroscopique des aortes et une souris est utilisée pour l'examen microscopique.

Pour interpréter les résultats, deux groupes de souris apoE^{-/-} mâles de 15 semaines, l'un traité au BM-573 et l'autre soumis à un placebo, est ajouté. De plus les résultats d'un groupe de souris C57BL/6J sont ajoutés. Les souris C57BL/6J constituent le fond génétique des souris apoE^{-/-}, elles sont considérées comme le témoin négatif de nos expériences (Cherdon et Rolin, non publié).

II.2.2. Prélèvement sanguin

II.2.2.1. Matériel

- Nembutal (Ceva Santé Animale)

- Citrate sodique (0,105 M, 9:1 vol/vol)
- Tube hépariné (vacuette MLS S.A)

II.2.2.2. Méthode

La souris est anesthésiée par une injection de Nembutal à 50 mg/kg. Ensuite une incision au niveau du thorax est réalisée, la cavité thoracique est ouverte afin de découvrir le cœur et les poumons. Deux gouttes de citrate sont déposées dans la cage thoracique de l'animal afin d'éviter les processus de coagulation. Pour le prélèvement sanguin, les poumons et l'apex du cœur sont sectionnés. Le sang est ensuite prélevé à l'aide d'une seringue citratée et déposé dans un tube hépariné. Les échantillons sont par la suite centrifugés à 6000 g durant 15 min afin de récupérer le plasma qui est conservé à -80°C .

II.2.3. Dosage plasmatique

II.2.3.1. Dosage lipidique

Les dosages lipidiques sont réalisés au Laboratoire de Biologie Clinique du CHU (ULg). Les dosages du cholestérol total, des triglycérides et du cholestérol HDL sont réalisés par colorimétrie (Figure 6). Le cholestérol HDL est dosé après la précipitation des autres lipoprotéines par le MgCl_2 /sulfate de dextran. La concentration en cholestérol LDL a ensuite été calculée à l'aide de la formule de Friedewald (Figure 7).

II.2.3.2. Dosage de sICAM-1, sVCAM-1 et de MCP-1

a. Principe

Le principe des dosages plasmatiques de sICAM-1, de sVCAM-1 et de MCP-1 est expliqué ci-dessus dans le point 1.3.3.1 reprenant le principe du dosage de MCP-1 dans le milieu de culture cellulaire. Le dosage de sICAM-1, de sVCAM-1 et de MCP-1 se déroule selon le protocole fournit, par la firme avec le kit.

b. Matériel

- Kit de dosage sICAM-1, *Mouse sICAM-1(CD54) Immunoassay*, (R&D system, Allemagne)
- Kit de dosage sVCAM-1, *Mouse sVCAM-1 Immunoassay* (R&D system, Allemagne)
- Kit de dosage MCP-1, *Mouse JE/MCP-1 Immunoassay* (R&D system, Allemagne)
- Lecteur de plaques mesurant l'absorbance à 450 nm (Thermo Multiskan Ascent)

II.2.3.3. Dosage de TXB_2

a. Principe

Le TXB_2 est le métabolite majeur du thromboxane A_2 . Ce dernier possède un temps de demi-vie trop court pour être dosé dans le plasma (Figure 9). Le dosage du TXB_2 est effectué selon le protocole fourni avec le kit de dosage immuno-enzymatique (kit EIA) *Thromboxane B_2 Enzyme Immunoassay kit*.

Le dosage du TXB₂ est basé sur la compétition pour un nombre limité de sites de liaison à l'anticorps du TXB₂ à doser et des molécules de TXB₂ marquées. Ainsi, des anticorps recouvrant le fond des puits de la plaque 96 puits sont incubés avec le TXB₂ de l'échantillon et avec le TXB₂ couplé à la phosphatase alcaline, les deux molécules entrent dès lors en compétition pour les sites de liaison de l'anticorps. Ensuite, le substrat de la phosphatase alcaline est ajouté, le produit de la réaction est dosé en colorimétrie. La densité optique obtenue est en conséquence inversement proportionnelle à la quantité de TXB₂ dosée dans le plasma (Figure 10).

b. Matériel

- Kit de dosage de TXB₂, *Thromboxane B₂ Enzyme Immunoassay kit* (Assay Design)
- Lecteur de plaque mesurant l'absorbance à 405 nm (Thermo Multiskan Ascent)

II.2.4. Méthode « en face »

II.2.4.1. Prélèvement de l'aorte

a. Matériel

- Solution de rinçage : PBS-EDTA (2 μM)
- Solution de fixation : Formal sucrose (4% paraformaldéhyde, 5% sucrose, 20 μM EDTA, pH 7,4)
- Solution de Formol 10%
- Plaque de paraffine
- Solution de coloration Sudan IV (5% de Noir Sudan IV dans une solution de 50% d'éthanol (70%) et 50% d'acétone.)

b. Méthode

Lorsque le sang est récupéré, une ouverture longitudinale sur toute la longueur de la souris est pratiquée. Les côtes, les systèmes gastro-intestinal et reproducteur ainsi que le foie la rate et le pancréas sont sectionnés et retirés, les reins sont laissés *in situ*. L'aorte est ensuite rincée par une solution de PBS + EDTA (10 mL) au moyen d'un cathéter inséré dans le ventricule gauche. L'aorte est fixée alors avec une solution de formal sucrose. Après la fixation, l'aorte est dégagée d'un maximum d'adhérences et d'amas graisseux. Ensuite, elle est ouverte longitudinalement depuis la bifurcation iliaque jusqu'à la crosse aortique, où elle sera ouverte en suivant la courbure interne de la crosse. L'artère carotide, la sous-clavière gauche et le tronc brachio-céphalique sont sectionnés et le cœur est enlevé par une coupe transversale à la base de la crosse aortique. L'aorte est alors détachée. Une incision est pratiquée le long de la courbure externe de la crosse aortique et les embranchements sont sectionnés en deux parties égales. L'aorte est enfin fixée à l'aide de fines épingles (0,1 mm) sur une plaque de paraffine et déposée dans une solution de formol 10% pour une fixation de minimum 12 heures.

Avant la coloration de l'aorte au Noir Sudan (Sudan IV), celle-ci est plongée dans un bain d'éthanol 70% durant 5 min puis déposée dans la solution de Noir Sudan durant 30 min. L'aorte est rincée à l'eau et redéposée dans le formol 10%. Le Noir Sudan soluble dans les lipides va permettre la coloration des plaques lipidiques en rouge. Par la suite, un logiciel, (HISTOLAB) numérise les photographies de l'aorte, détecte les zones colorées en rouge, et

permet la quantification des plaques lipidiques par le calcul de la surface recouverte par ces plaques sur la surface totale de l'aorte.

II.2.5. Coupes histologique

II.2.5.1. Prélèvement de l'aorte

a. Matériel

- PBS/EDTA
- Formaldéhyde 10%
- Tissue Tek (Sakura)

b. Méthode

Le prélèvement de l'aorte se déroule selon le protocole décrit ci-dessus. Néanmoins pour les coupes histologiques, l'aorte n'est pas perfusée avec la solution de fixation mais est rincée abondamment avec le PBS-EDTA (20 mL). Une fois l'aorte dégagée de ses adhérences, elle est retirée de la souris. Ensuite, des sections transversales de la crosse aortique, de la partie thoracique et de la partie abdominale sont prélevées. Une partie de ces segments est immédiatement déposée dans une solution de formaldéhyde 10%, ils seront destinés à la coloration à l'Hématoxyline & Eosine (H&E) après inclusion en paraffine. L'autre partie des segments est incluse dans du *Tissue-Tek*, congelée sur des pastilles de carboglace et conservée à -80°C .

II.2.5.2. Histologie sur prélèvements inclus en paraffine

Après fixation des échantillons, ceux-ci sont déposés dans de l'agar-agar afin de les maintenir dans l'orientation escomptée (lumière). Les échantillons sont déshydratés par plusieurs passages dans un bain d'alcool et de toluène, ils sont ensuite montés en paraffine afin de réaliser des coupes au microtome de $5\text{ }\mu\text{M}$ d'épaisseur déposées enfin sur les lames de verres prétraitées (Superfrost Plus, Labonord, France).

a. Coloration H&E

La coloration à l'Hématoxyline/Eosine (H&E) mettant en évidence les noyaux (mauve) et les éléments du cytoplasme (rose) est réalisée au Laboratoire d'Anatomie pathologique du CHU par une machine linéaire Shandon Linistain GLX qui plonge les lames dans une série de bains de réhydratation, de rinçage et de coloration.

b. Coloration à l'orcéine

Les coupes sont passées dans un bain de xylène pour dissoudre la paraffine, puis sont plongées dans un bain d'alcool. La coloration spéciale à l'orcéine met en évidence les fibres élastiques en rouge, elle se pratique par immersion des lames dans un bain d'orcéine durant 10 min. Les lames sont rincées alors à l'alcool et à l'eau pour éliminer l'excès d'orcéine. Pour terminer, une contre-coloration au picroindigocarmin (carmin d'indigo 5,3 mM ; acide picrique 742 mM) est réalisée, elle colore le fond tissulaire en jaune (acide picrique) et le collagène en vert (indigocarmin).

II.2.5.3. Histologie sur prélèvements congelés

Des coupes de 5 μ M d'épaisseur sont réalisées par un cryomicrotome (Cryostat vacutome HM 500) et déposées sur les lames de verres traitées au silane. Une partie de ces lames est destinée à la coloration *Oil Red O* tandis que la seconde partie est colorée à l'H&E.

a. Coloration Oil Red O

Matériel

- Formol 10%
- PBS
- Isopropanol 60%
- Solution de coloration : *Oil Red O* (13mM dans l'isopropanol) 5% dilué dans du propanol 60%
- Hématoxyline de Mayer

Méthode

La coloration ORO (*Oil Red O*) mettant en évidence les lipides se déroule comme suit. Les lames de verre sur lesquelles ont été déposés les prélèvements sont fixées en étant déposés dans un récipient saturé en vapeur de formol 10% durant 45 min. Les prélèvements sont ensuite réhydratés par immersion dans le PBS pendant 3 min et plongés dans l'isopropanol 60% durant 5 min. Ensuite la solution de coloration est déposée pendant 30 min. La solution de coloration en excès est enlevée en plongeant les lames dans un bain d'isopropanol 60%, puis celles-ci sont rincées à l'eau distillée. Avant de procéder à la seconde coloration, les prélèvements sont réhydratés dans un bain de PBS pour être ensuite contre-colorés à l'Hématoxyline de Mayer durant 5 min.

b. Coloration H&E

Matériel

- Carbowax 2%
- Hématoxyline de Carazzi (AlKO_8S_2 194 mM ; 0,93 mM KIO_3 ; Hématoxyline 7 mM ; Glycérine 2,73 M, eau distillée)
- Eosine 0,5%
- Isopropanol
- Xylène

Méthode

Les lames sont fixées dans une solution de Carbowax, rincées à l'eau distillée 3 secondes et colorées à l'Hématoxyline de Carazzi pendant 45 secondes. Les lames sont par la suite rincées à l'eau distillée puis à l'eau de distribution pour être colorées à l'éosine. Pour terminer les lames sont passées dans trois bains d'isopropanol et de xylène.

II.3. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm l'écart type pour chacun des groupes (Moyennes \pm SD).

Les comparaisons entre les différents groupes expérimentaux ont été effectuées au moyen d'un test statistique non paramétrique (Mann-Whitney) grâce au logiciel INSTAT. Une probabilité inférieure à 5% a été considérée comme significative.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Evaluation *in vitro* de modulateurs du TXA₂ sur cellules endothéliales

L'adhérence, l'activation et la migration des monocytes et des lymphocytes de l'endothélium vers l'intima jouent un rôle important dans l'évolution vers la plaque athéromateuse. Dans cette étape initiale, l'expression de molécules d'adhérence telles que ICAM-1 et VCAM-1 à la surface endothéliale mais aussi de chémokines telles que MCP-1 est essentielle (Cotran and Mayadas-Norton, 1998)

Ainsi, dans un premier temps, nous souhaitons évaluer l'influence du TXA₂ et du 8-iso-PGF_{2α} sur l'expression endothéliale d'ICAM-1. Cette dernière est surexprimée à la surface des cellules endothéliales après stimulation par des cytokines proinflammatoires ou par des eicosanoïdes tels le TXA₂ et le 8-iso-PGF_{2α} (Leitinger et al., 2001). A la suite d'une stimulation par des cytokines, les cellules endothéliales produisent également la MCP-1.

Le modèle in vitro étudié utilise des cellules endothéliales humaines EAhy926, une lignée cellulaire issue de la fusion entre des cellules endothéliales de cordon ombilical humain (HUVECs, human umbilical vein endothelial cells) et des cellules d'un carcinome de poumons (A549). Ces cellules ont été choisies pour la facilité de manipulation qu'offre la lignée cellulaire. Les cellules EAhy926 arrivent rapidement à confluence et ne sont pas limitées par un nombre de passages pour les manipulations.

Les souches de cellules endothéliales HUVECs ont déjà démontré leur sensibilité aux agonistes du récepteur TP, tel le U-46619, notamment par une augmentation de l'expression de chémokines et de molécules d'adhérence. C'est pourquoi la lignée EAhy926 nous semblait idéale pour l'étude de modulateurs du récepteur TP. Si les cellules EAhy926 possèdent, en effet, les caractéristiques des cellules endothéliales, elles restent plus facilement manipulables que les souches cellulaires telles les HUVECs, les cellules endothéliales d'aorte humaine HAECs (human aortic endothelial cells) ou les cellules endothéliales d'aorte bovine BAECs (bovine aortic endothelial cells)

III.1.1. Evaluation de molécules agonistes et antagonistes du récepteur TP sur la production de MCP-1 par les cellules endothéliales EAhy926

La MCP-1 est une chémokine produite par les cellules endothéliales et les macrophages durant la réaction inflammatoire. Comme nous l'avons abordé dans l'introduction, cette chémokine permet de diriger les monocytes vers le site de l'inflammation après la transmigration.

Dans la formation des lésions athéromateuses, la diapédèse des monocytes et leur accumulation dans l'intima constitue la première étape de l'initiation de la lésion. La diapédèse des monocytes nécessite l'expression de molécules d'adhérence et de chémokines par les cellules endothéliales. La MCP-1 constitue donc un marqueur de l'inflammation à l'origine de l'initiation de la lésion.

Ainsi, le dosage de MCP-1 dans le milieu de culture des cellules endothéliales EAhy926 permet d'évaluer l'impact des molécules testées sur l'expression de cette chémokine et donc, sur l'inflammation.

Dans un premier temps, la MCP-1 a été dosée après stimulation avec des agonistes du récepteur TP et le TNF α . Le TNF α est une cytokine proinflammatoire qui entraîne l'adhérence des monocytes par l'augmentation de l'expression de molécules d'adhérence et de chémokines ; il est utilisé comme contrôle positif dans nos expériences. Les agonistes du récepteur TP utilisés sont le U-46619 et le 8-*iso*-PGF $_{2\alpha}$. En plus de leur activité stimulante des plaquettes et de la musculature lisse vasculaire, ces molécules sont aussi décrites comme capables d'augmenter l'expression de MCP-1.

Pour chacun de ces agents stimulants, un effet dose ainsi qu'un effet temps ont été initialement réalisés pour évaluer la concentration et le temps de stimulation nécessaires pour augmenter la production de MCP-1 par les cellules endothéliales. Dans un second temps, l'effet d'un antagoniste de référence du récepteur TP, le SQ-29548 a été investigué sur l'expression de la MCP-1 par ces agents stimulants. Enfin, l'effet d'un antagoniste original du récepteur TP développé au laboratoire, le BM-573 qui possède des propriétés inhibitrices de la thromboxane synthétase et antagonistes du récepteur TP, a été testé.

III.1.1.1. Stimulation avec les agonistes du récepteur TP

a. Mode opératoire

Les cellules EAhy926 ont été stimulées par le TNF α , le U-46619 et le 8-*iso*-PGF $_{2\alpha}$ durant 4, 6 et 24 heures. Pour chaque temps de stimulation, le TNF α a été testé à quatre concentrations (1, 5, 10 et 50 ng/mL), le U-46619 et le 8-*iso*-PGF $_{2\alpha}$ ont été testés aux concentrations de 0,1, 1, 10 et 30 μ M. Après stimulation, la MCP-1 et la quantité de protéines ont été dosées dans le milieu d'incubation. Les concentrations de ces agents ont été choisies sur base d'études publiées utilisant des cellules endothéliales HUVECs (Ishizuka et al., 1998; Ishizuka et al., 2000; Ishizuka et al., 1996)

b. Résultats avec les agents stimulants

- Stimulation des cellules pendant 4 heures

Les cellules stimulées par le TNF α pendant 4 heures montrent bien une augmentation de la concentration en MCP-1 par rapport aux cellules contrôles non stimulées. En effet, le taux basal de MCP-1 se situe à 0,17 pg/ μ g de protéine. Le TNF α (1 ng/mL) entraîne une augmentation d'un facteur 11 du taux de MCP-1 avec 1,83 pg/ μ g de protéine. Cet effet est dépendant de la concentration en TNF α . Ainsi, si à des concentrations de 5 et 10 ng/mL, aucune augmentation significative de la production de MCP-1 n'est visible, on observe une augmentation du taux de MCP-1 à 30 ng/mL en comparaison à 1 ng/mL en TNF α (Figure 1).

Les agonistes du récepteur TP, le U-46619 et le 8-*iso*-PGF $_{2\alpha}$, contrairement à toute attente, n'ont aucun effet sur l'expression de la chémokine MCP-1. En effet, la production de MCP-1 est similaire au taux basal mesuré dans les puits contrôles et ce quelle que soit les concentrations étudiées (Figure 1).

- Stimulation des cellules pendant 6 heures

Après 6 heures d'incubation avec les cellules, le TNF α augmente la concentration en MCP-1 dans le milieu néanmoins, l'augmentation n'est pas supérieure à celle qui fut observée

lors d'une stimulation pendant 4 heures. En effet, le taux moyen de MCP-1 est de 4,7 pg/ μ g de protéine après une stimulation à 1 ng/mL soit 9 fois supérieur au taux basal, or, lors de la stimulation pendant 4 heures, la concentration en MCP-1 était 11 fois supérieure au taux basal. Si, un effet dose-réponse en TNF α est toutefois observé, à 10 ng/mL, la concentration en MCP-1 mesurée s'éloigne quelque peu de cette tendance à la hausse; probablement en raison d'écart-type élevé.

Le U-46619 et le 8-*iso*-PGF_{2 α} , à 6 heures, n'induisent toujours pas d'augmentation de la production de MCP-1 par les cellules EAhy926 (Figure 2).

L'effet n'étant toujours pas perceptible, les durées de stimulation ont été augmentées pour ces deux médiateurs.

- Stimulation des cellules pendant 24 heures

La stimulation de 24 heures avec le U-46619 et le 8-*iso*-PGF_{2 α} n'est toujours pas suffisante pour observer une augmentation de la concentration en MCP-1 dans le milieu de culture cellulaire. Les cellules EAhy926 ne répondent toujours pas aux agents stimulants sensés augmenter le taux de MCP-1. Ainsi, dans nos expériences, le taux mesuré après stimulation ne dépasse pas la production basale de MCP-1 par les cellules contrôles (2,53 pg/ μ g de protéine) (Figure 3).

Soulignons que la concentration en MCP-1 est un peu élevée pour le contrôle constitué du milieu de culture avec du DMSO. En effet, le taux basal de MCP-1 est près de 15 fois plus élevé en comparaison au taux basal de MCP-1 produit après une stimulation de 4 heures. Or, il ne devrait être que 6 fois plus élevé. L'explication de cette surproduction de MCP-1 par les cellules est probablement due à un stress subit par celles-ci. Une autre explication est que le MCP-1 peut également stimuler sa propre production par un mécanisme de *feed back* positif.

c. Conclusion

Les stimulations des cellules EAhy926 avec les agonistes du récepteur TP n'ont pas été en mesure d'augmenter la production de la MCP-1. Les cellules EAhy926 restent insensibles à ces agonistes quelles que soient leur concentration et le temps de stimulation. Cependant ces cellules répondent au TNF α , et ce, aux plus faibles concentrations (1 ng/mL) après une stimulation de 4 heures.

III.1.1.2. Effets d'antagonistes du récepteur TP

a. Mode opératoire

Bien que les cellules EAhy926 ne répondaient pas aux agonistes du récepteur TP, un antagoniste du récepteur TP a cependant été testé sur les cellules stimulées au TNF α durant 6 heures. Il est en effet décrit que le SQ-29548, antagoniste de référence du récepteur TP, est capable à 1 μ M de diminuer la concentration en MCP-1 produite par des cellules HUVECs stimulées par le TNF α à 10 ng/mL (Ishizuka et al., 2000)

L'antagoniste SQ-29548 a été déposé dans le milieu 1 heure avant la stimulation au TNF α (1ng/mL). L'effet du SQ-29548 a été étudié à des concentrations de 0,02, 0,2 et 2 μ M. Pour évaluer l'importance de l'activité de l'antagoniste sur la production de MCP-1, un inhibiteur de la voie de signalisation de NF- κ B est également utilisé comme contrôle, le BAY 11-7082 (10 μ M, 20 μ M).

Le BM-573, une sulfonylurée nitrobenzénique développée au laboratoire de Chimie Pharmaceutique de l'Université de Liège, qui possède également des propriétés antagonistes du récepteur TP, a également été déposé 1 heure avant la stimulation au TNF α (1 ng/mL), tout comme le SQ-29548. Le BM-573 a été testé aux concentrations de 0,1, 1 et 10 μ M.

b. Résultats avec le SQ-29548

La figure 4 montre les concentrations en MCP-1 après stimulation des cellules par le TNF α avec et sans le SQ-29548.

Le TNF α est à l'origine d'une augmentation de la synthèse de MCP-1 qui atteint alors la valeur de 5 pg/ μ g de protéine, soit un taux nettement supérieur au taux basal de MCP-1 de 0.2 pg/ μ g de protéine.

L'incubation des cellules avec le BAY 11-7082, inhibiteur de référence de NF- κ B a pour conséquence une diminution de la concentration en MCP-1 dans le milieu. A 10 μ M, le BAY 11-7082 diminue de manière significative la production de MCP-1 par les cellules EAhy926. La diminution est encore plus importante à 20 μ M ($p < 0,05$).

Le SQ29548 diminue le taux de MCP-1 dans le milieu, bien que cette diminution soit moins marquée en comparaison avec l'inhibition exercée par le BAY 11-7082. A 2 μ M, le SQ-29548 réduit de manière significative la concentration en MCP-1 ($p < 0,05$).

c. Résultats avec le BM-573

Si le SQ-29548 est capable de réduire la production de MCP-1 par les cellules endothéliales EAhy926 stimulées au TNF α , le BM-573 n'est cependant pas capable d'influencer la production de cette chémokine. En effet, comme le montre le graphe de la figure 5, une incubation préalable avec le BM-573 à différentes concentrations (0,1; 1; 10 μ M) reste sans effet sur la production de MCP-1 par les cellules stimulées au TNF α (Figure 5).

d. Conclusion

Au terme de l'étude avec les antagonistes du récepteur TP, le SQ-29548 à 0,2 μ M s'est montré capable de diminuer significativement ($p < 0,05$) le taux de MCP-1 dans le milieu de culture. Par contre, le BM-573 ne réduit pas la concentration en MCP-1 induite par le TNF α .

III.1.2. Evaluation de molécules agonistes du récepteur TP sur l'expression d'ICAM-1 en surface des cellules EAhy926

La molécule d'adhérence de la superfamille des immunoglobulines ICAM-1 est responsable de l'infiltration des monocytes vers l'intima. ICAM-1 joue un rôle clé dans la formation des lésions athéromateuses. Plusieurs études ont montré que des agonistes du récepteur TP sont capables d'induire l'expression d'ICAM-1 en surface des cellules HUVECs (Ishizuka et al., 1998). De plus, le ténitroban, un antagoniste du récepteur TP est capable de diminuer l'expression d'ICAM-1 en surface des cellules HUVECs et par conséquent, de diminuer l'adhérence des monocytes à ces mêmes cellules (Cayatte et al., 2000).

Parallèlement aux études de dosages de MCP-1 produit par les cellules endothéliales, l'expression d'ICAM-1 en surface des cellules EAhy926 a été investiguée et estimée par

immunofluorescence afin de rendre compte de l'effet du U-46619 et du 8-*iso*-PGF_{2α} sur l'activation de l'endothélium. Par ces expériences, nous souhaitions voir si les cellules EAhy926 étaient sensibles ou non aux agonistes du récepteur TP. Le TNFα a été utilisé comme contrôle positif.

III.1.2.1. Mode opératoire

Les agonistes du récepteur ont été testés pour évaluer de manière non quantitative leur capacité à induire l'expression d'ICAM-1. Une immunofluorescence a alors été réalisée sur les cellules endothéliales stimulées au TNFα à 1 et 10 ng/mL, au U-46619 à 10 μM et au 8-*iso*-PGF_{2α} à 10 μM durant 15 heures.

III.1.2.2. Analyse des résultats

Sur les photographies prises au microscope confocal à fluorescence, la fluorescence bleue indique l'emplacement des noyaux des cellules EAhy926 et la fluorescence verte rend compte de l'abondance d'ICAM-1 en surface des cellules (Figure 6). La fluorescence bleue est associée à l'agent intercalant To-Pro 3 tandis que la fluorescence verte est émise par le fluorochrome couplé à l'anticorps secondaire qui indique l'abondance d'ICAM-1 reconnu par l'anticorps primaire.

Le champ présent sur les clichés est représentatif de l'état général des cellules dans la population cellulaire. Les cellules non stimulées (contrôle et contrôle DMSO) n'émettent pas de fluorescence verte signifiant donc l'absence d'ICAM-1 en surface des cellules au repos. La stimulation au TNFα est à l'origine de l'augmentation de l'expression d'ICAM-1 par les cellules EAhy926. Ceci est visible par l'apparition de fluorescence verte marquée à la surface cellulaire.

Toutefois, le U-46619 et le 8-*iso*-PGF_{2α} n'entraînent pas l'expression d'ICAM-1 par les cellules endothéliales EAhy926. Ainsi, les photographies des cellules stimulées par ces agonistes sont en tout point similaires à celles obtenues pour le contrôle ; aucune fluorescence verte n'est émise.

III.1.2.3. Conclusion

Dans les résultats précédents, le U-46619 et le 8-*iso*-PGF_{2α} sont incapables d'augmenter la concentration en MCP-1.

Par l'immunofluorescence, nous avons pu mettre en évidence que les agonistes du récepteur TP, contrairement au TNFα n'induisent pas l'expression d'ICAM-1 en surface des cellules EAhy926.

III.1.3. Discussion de l'étude sur cellules endothéliales

L'objectif de l'étude sur cellules endothéliales était de montrer la capacité potentielle du BM-573 à inhiber l'expression des molécules d'adhérence en surface de l'endothélium ainsi que l'expression de la chémokine MCP-1. En effet, le récepteur TP avec lequel interagit le BM-573, est reconnu comme un facteur favorisant l'athérogenèse, notamment en favorisant l'étape initiatrice lors de la formation des lésions athéromateuses, la transmigration et l'accumulation des monocytes au sein de la couche intimale de la paroi artérielle.

Toutefois les expériences que nous avons menées sur les cellules EAhy926 se sont révélées infructueuses. Dans un premier temps, le dosage de la MCP-1 dans le milieu de culture cellulaire a démontré l'incapacité des agonistes du récepteur TP à augmenter la production de la chémokine. Des expériences menées auparavant sur cellules endothéliales en culture (HUVECs) ont pourtant établi que l'agoniste de référence du récepteur TP, le U-46619 augmentait la production d'ARN messenger codant pour le MCP-1 ainsi que la production de la protéine dans le milieu. De plus, l'incubation préalable des HUVECs avec un antagoniste de ce récepteur comme le SQ-29548 diminuait significativement la sécrétion de MCP-1 (Ishizuka et al., 2000).

Ces résultats obtenus pour les cellules HUVECs ne semblent pas transposables à la lignée dérivée de ces mêmes cellules, les cellules EAhy926. Bien que les cellules endothéliales EAhy926 répondent au stimulus engendré par le TNF α par une production de MCP-1, les agonistes du récepteur TP n'entraînent aucune réponse de ces cellules. L'hypothèse à laquelle nous sommes arrivés face à ces résultats contradictoires met en cause le type cellulaire. Les cellules EAhy926 proviennent certes des cellules HUVECs mais l'hybridation de ces cellules avec les cellules immortelles serait peut-être à l'origine de la perte du récepteur TP nécessaire à l'induction de la transduction du signal dont découle l'augmentation de la production de MCP-1 et l'expression de molécule d'adhérence en surface des cellules endothéliales.

Dans un second temps, les antagonistes du récepteur TP ont été testés sur les cellules EAhy926 stimulées par le TNF α et leur effet a été comparé à un inhibiteur de NF- κ B. Le BAY 11-7082, à 10 μ M, est en effet capable de diminuer le taux de MCP-1 dans le milieu de culture cellulaire ; ce qui confirme son effet inhibiteur. Le BAY 11-7082 exerce son action inhibitrice sur l'enzyme responsable de la phosphorylation de l'inhibiteur du facteur de transcription NF- κ B, I κ B. L' I κ B est une protéine qui retient NF- κ B dans le cytoplasme et qui nécessite d'être phosphorylée pour acquérir l'étiquette de polyubiquitine, un signal pour la dégradation dans le protéasome. Lors de l'inhibition de la kinase d'I κ B, le NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme et est donc incapable d'induire la transcription de gènes cibles, comme le gène codant pour la MCP-1.

De plus, nous observons que malgré l'absence d'effet des agonistes du récepteur TP, l'antagoniste de référence, le SQ-29548 est cependant capable de diminuer la production de MCP-1 induite par le TNF α . Ishizuka *et al* ont déjà démontré que le TNF α et le U46619 étaient capables d'induire la production de MCP-1 par des cellules HUVECs. La synthèse de MCP-1 serait induite par l'activation de la protéine kinase C qui phosphoryle I κ B et qui permet la translocation de NF- κ B dans le noyau et donc la transcription du gène codant pour la MCP-1. De plus, dans leur étude, l'antagoniste du récepteur TP, le SQ-29548 est capable de diminuer la production de MCP-1 induite par le TNF α ou le U-46619. En effet, les auteurs ont observé une diminution du taux de MCP-1 au niveau protéique et au niveau de l'ARN messenger codant pour celle-ci en comparaison aux taux obtenus pour les stimulations avec le U-46619 ou le TNF α seul. Selon Ishizuka *et al*, le TNF α serait notamment responsable de la production de thromboxane A₂ par les cellules HUVECs. Le thromboxane A₂ interagirait avec son récepteur TP et entraînerait l'activation de la protéine kinase C. Ceci expliquerait la diminution du taux de MCP-1 à la suite de l'incubation des cellules avec l'antagoniste du récepteur TP (Ishizuka et al., 2000).

Toutefois les résultats obtenus pour les cellules EAhy926 ne concordent pas avec ceux qui sont décrits dans la littérature pour les HUVECs. La stimulation des cellules EAhy926 avec les agonistes du récepteur TP nous a conduit à l'hypothèse que le récepteur TP serait absent en surface des cellules. L'antagoniste du récepteur TP, le SQ-29548 est cependant capable de produire un effet sur la production de MCP-1 induite par le TNF α alors qu'il est

supposé interagir avec le récepteur TP pour exercer ces effets. L'absence de récepteur TP étant l'hypothèse la plus plausible bien qu'elle ne soit pas démontrée actuellement, les effets du SQ-29548 seraient alors attribuables à une autre voie de transduction du signal. Cet antagoniste du récepteur TP serait peut-être capable d'interagir avec un autre récepteur qui lui permettrait de limiter la production de MCP-1 induite par le TNF α .

Comme le SQ-29548 montrait un effet vis-à-vis des cellules stimulées par le TNF α , il nous paraissait opportun d'investiguer l'activité d'un antagoniste original synthétisé au laboratoire, le BM-573, afin de vérifier si cette molécule était aussi capable de réduire la production de marqueurs de l'inflammation comme le MCP-1. En effet, d'autres antagonistes comme le ténitroban sont actuellement en phase clinique III et sont capables de « tempérer » la réaction inflammatoire à l'origine de la formation des lésions athéromateuses (Verbeuren, 2006). Le BM-573 est un dérivé du torasémide dont le noyau pyridinique a été substitué par un nitrobenzène ; cette substitution a pour conséquence une forte affinité de la molécule pour le récepteur TP qui est supérieure à celle de l'antagoniste de référence, le SQ-29548. Les propriétés anti-agrégantes et myorelaxantes du BM-573 ont été largement démontrées (Dogné et al., 2004; Rolin et al., 2001). Néanmoins, les résultats obtenus avec le BM-573 indiquent que la molécule, contrairement au SQ-29548, est incapable de réduire la production de MCP-1 par les cellules EAhy926 stimulées avec le TNF α . Selon notre hypothèse de départ qui prônerait l'absence de récepteur TP en surface des cellules EAhy926, il semble normal que le BM-573 ne puisse exercer son action antagoniste sur le récepteur TP. Les résultats obtenus pour le BM-573 renforcent donc cette hypothèse.

Au vu des résultats obtenus pour le MCP-1, l'hypothèse de l'insensibilité des cellules EAhy926 aux agonistes du récepteur est renforcée par les photographies de l'immunofluorescence, dont les résultats montrent clairement qu'aucun des agonistes n'est capable d'augmenter l'expression d'ICAM-1 à la surface des cellules. Or, les données décrites dans la littérature montrent à l'inverse que l'activation du récepteur TP par un agoniste est un facteur favorisant l'athérosclérose, notamment par l'augmentation de l'expression des molécules d'adhérence. Les agonistes du récepteur TP sont, en effet, capables d'augmenter l'expression d'ICAM-1, de VCAM-1 en surface des cellules HUVECs (Ishizuka et al., 1998). De plus, la stimulation de cellules HUVECs et HAECs avec l'isoprostane 8-*iso*-PGF $_{2\alpha}$ et le U-46619 sont capables d'induire l'expression des molécules d'adhérence et l'adhérence des monocytes U937 aux cellules endothéliales (Leitinger et al., 2001). Ces derniers résultats renforcent dès lors l'hypothèse de l'absence du récepteur en surface de cellules EAhy926.

C'est pourquoi un *western blot* a été envisagé pour mettre en évidence la présence ou non du récepteur TP. En effet, l'absence du récepteur serait une explication raisonnable à l'insensibilité des cellules EAhy926. Malheureusement, suite à certains problèmes techniques, le Western Blot n'a pas pu nous fournir les résultats escomptés. Le temps qui nous était imparti étant trop court, il ne nous a pas été possible de recommencer l'expérience. Les résultats du *western blot* ont montré que l'anticorps était peu spécifique. De plus, aucune bande sur le film photographique ne pouvait correspondre à la protéine à mettre en évidence, l'isoforme β du récepteur TP à 64kD. En effet, le contrôle positif (des plaquettes humaines) n'exprimait que très faiblement la protéine, et le poids moléculaire de la protéine ne correspondait pas à ce qui aurait dû être retrouvé pour l'isoforme α (55 kD), l'isoforme du récepteur TP majoritaire au niveau des plaquettes. L'échec du *western blot* pourrait être attribué au protocole utilisé pour la lyse cellulaire. En effet, le récepteur TP est une protéine membranaire plus difficile à extraire.

III.2. Evaluation *in vivo* de modulateurs du TXA₂ chez des souris athéromateuses

Dans la seconde partie de ce mémoire, une expérimentation *in vivo* utilisant un modèle murin d'athérosclérose a été mise au point. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec le CREDEC (Centre de Recherche Expérimentale du département de Chirurgie Cardiovasculaire), le Service d'Anatomie pathologique et l'Animalerie centrale du CHU de l'Université de Liège.

Parmi les nombreux modèles de souris knock out existant, les souris apoE^{-/-} ont retenu toute notre attention. En effet, ces souris développent spontanément des lésions athéromateuses même lorsqu'elles sont soumises à un régime alimentaire non enrichi en graisse.

Différentes études ont montré le rôle important des prostanoïdes dépendant de la cyclooxygénase de type 1 (COX-1) dans l'athérogenèse. Ainsi, l'inhibition de la COX-1 par des agents pharmacologiques tels l'indométhacine ou l'aspirine ont permis de mettre en évidence un retard dans la progression des lésions chez des souris (LDLR^{-/-}) (Cyrus et al., 2002; Cyrus et al., 2007; Pratico et al., 2001). De plus, la suppression du gène de la COX-1 a également mis en évidence une réduction de l'athérogenèse chez des souris apoE^{-/-} (Egan et al., 2005). Toutefois, les molécules inhibant la COX-1 n'agissent pas sur la synthèse d'isoprostanes. Or, il est clairement démontré que ces eicosanoïdes jouent un rôle important dans l'athérogenèse, notamment en interagissant avec le récepteur TP, par une activité agoniste. Aussi, neutraliser le récepteur TP dans le but de ralentir la progression des lésions constitue une approche intéressante et innovante à l'heure où de nouvelles molécules réduisant la cholestérolémie ou ralentissant la progression des lésions au niveau de la paroi vasculaire sont très attendues, particulièrement celles qui agiraient sur de nouvelles cibles. En effet, les traitements actuels de cette pathologie vasculaire chronique consistent à en maîtriser les facteurs de risque ; le principal étant le taux plasmatique élevé en cholestérol. Les statines, des molécules hypocholestérolémiantes, sont les médicaments actuels les plus efficaces contre l'athérosclérose. Toutefois, la diminution de la mortalité due aux maladies cardiovasculaires n'est observée que chez un tiers des patients sous statine. De plus, la prise de statines peut être associée à de nombreux effets indésirables qui limitent leur utilisation chez certains patients. Récemment, les essais cliniques du torcetrapib (molécule capable d'augmenter les taux de HDL) ont été interrompus par la firme Pfizer en raison d'une augmentation de la mortalité et des accidents cardiovasculaires chez les patients traités aussi par une statine.

L'aspirine, un inhibiteur non sélectif des cyclooxygénases sera investiguée dans ce modèle en comparaison au BM-573, un répresseur original de la voie du thromboxane A₂, et associé à cette sulfonylurée nitrobenzénique lors d'une administration orale dans l'eau de boisson. L'association de ces deux molécules aura pour effet de bloquer la production de TXA₂ et l'action du 8-iso-PGF_{2α} au niveau des récepteurs au TXA₂. Par ce modèle, nous souhaitons montrer l'impact de l'association du BM-573 à l'aspirine afin d'observer les effets préventifs potentiels synergiques sur la progression des lésions athéromateuses, sur l'amélioration des taux plasmatiques des lipides et des marqueurs de l'inflammation.

Comme nous l'avons exposé dans l'introduction, outre une affinité élevée pour le récepteur TP, le BM-573 possède des propriétés antiagrégantes et relaxantes de la musculature lisse vasculaire ; ce composé original est donc susceptible de jouer un rôle

protecteur dans la pathologie athéromateuse. Soulignons que Cyrus et al. ont déjà mis ce rôle en évidence chez des souris *RLDL^{-/-}* soumises à un régime riche en graisse. Le traitement de ces souris au BM-573 a, en effet, révélé une diminution de l'étendue des lésions en comparaison aux souris non traitées (Cyrus et al., 2007).

Lors de l'étude du modèle de souris *apoE^{-/-}* âgées de 15 semaines, soit après 9 semaines de traitement, divers dosages plasmatiques ont été réalisés dans un premiers temps. Dans un second temps, un examen des lésions de l'aorte a été opéré. Ainsi, d'un point de vue macroscopique, la taille et l'étendue des lésions sont évaluées par la méthode « en face » qui permet de mettre en évidence les plaques d'athérome sur l'aorte ouverte longitudinalement. Un examen histopathologique de l'aorte en coupe transversale a également permis de visualiser la composition de ces plaques.

III.2.1. Dosages plasmatiques

La première partie de l'étude *in vivo* utilisant un modèle murin d'athérosclérose comporte les dosages plasmatiques des triglycérides, du cholestérol total, LDL et HDL. Le thromboxane B₂, métabolite stable et majeur du thromboxane A₂, a également été dosé dans le plasma, de même que divers marqueurs de l'inflammation tels ICAM-1s, VCAM-1s et la chémokine MCP-1. Cette évaluation biochimique a pour objectif de montrer l'efficacité de l'aspirine sur l'étendue la réduction des lésions, mais aussi de montrer un effet synergique du BM-573 par sa capacité à réprimer l'action du TXA₂. Ces souris *apoE^{-/-}* traitées seront comparées à des souris traitées uniquement au BM-573 à 30-40 µg/animal/jour (soit 2-2,6 mg/kg).

Soulignons que les résultats présentés ici et concernant le groupe de souris *apoE^{-/-}* (témoin positif) et le groupe traité uniquement au BM-573 ont été obtenus antérieurement, de même que les résultats exposés pour les souris C57BL/6J (fond génétique) (Cherdon et Rolin, non publiés).

III.2.1.1. Les lipides

Le dosage plasmatique du cholestérol LDL, HDL, du cholestérol total et des triglycérides sont effectués dans le but de suivre l'évolution de ces lipides au fil du temps et de déceler un éventuel effet de l'aspirine et de l'administration simultanée du BM-573 et de l'aspirine seule sur ces concentrations. En effet, les LDL ou « mauvais cholestérol » favorisent la pathologie athéromateuse tandis que les HDL ou « bon cholestérol » jouent un rôle protecteur dans l'athérosclérose notamment par leurs rôles dans le transport inverse du cholestérol.

a. Analyse des résultats

Le graphe repris à la figure 7 indique les concentrations en triglycérides, en cholestérol total, LDL et HDL pour 5 groupes de souris.

Le premier groupe est constitué des souris C57BL/6J, le fond génétique des souris *apoE^{-/-}*. Ces souris sont les témoins négatifs de cette expérience. En effet en comparaison aux autres groupes de souris *apoE^{-/-}*, les taux de cholestérol total (64 mg/dL), LDL (8 mg/dL) et HDL (53,5 mg/dL) pour les C57BL/6J sont nettement plus faibles.

En revanche, les témoins positifs représentés par les souris *apoE^{-/-}* soumises à un placebo (*vehicule*) montrent un taux de cholestérol total de 372 mg/dL. De plus, ce groupe montre une concentration en cholestérol HDL (146,3 mg/dL) plus faible que celle du

cholestérol LDL (264,75mg/dL). Alors que chez souris C57BL/6J, la concentration en HDL est supérieure à la concentration en LDL.

Le groupe composé des souris traitées au BM-573 montre un taux similaire en triglycérides et en cholestérol total en comparaison au témoin positif. Par contre, si une augmentation des concentrations en triglycérides (131 mg/dL) et en cholestérol total (581,5 mg/dL) est observée dans les groupes de souris apoE^{-/-} traitées à l'aspirine, cette augmentation est toutefois moindre pour les groupes traités avec l'aspirine et le BM-573 ; les taux de triglycérides et de cholestérol total étant respectivement de 51,4 mg/dL et de 455 mg/dL dans ce groupe.

b. Conclusion

Le BM-573, à 30-40 µg/jour/animal (soit 2-2,6 mg/kg) ne modifie pas les concentrations en lipides plasmatiques chez les souris apoE^{-/-}. En revanche, contre toute attente, il est observé que le traitement à l'aspirine à 300-400 µg/jour/animal (soit 20-26 mg/kg) augmente les concentrations en lipides plasmatiques en comparaison au contrôle positif.

III.2.1.2. Dosage du TXB₂

Le TXA₂, très instable, possède un temps de demi-vie très court ; c'est pourquoi il est rapidement métabolisé dans l'organisme en métabolite inactif, le TXB₂. C'est donc ce métabolite qui sera dosé dans le plasma sanguin pour rendre compte de la concentration en TXA₂. Le TXA₂ est comme décrit précédemment un agent favorisant l'activation plaquettaire, la vasoconstriction et l'activation endothéliale et qui globalement en raison de ses propriétés, favorise l'athérogenèse. Le dosage du TXB₂ permettra dès lors de mettre en évidence les propriétés inhibitrices de la thromboxane synthétase que possède le BM-573 et de comparer ses effets avec l'aspirine qui elle aussi, est supposée diminuer la production de thromboxane A₂ en inhibant les cyclooxygénases.

a. Analyse des résultats

Le dosage du TXB₂ plasmatique chez les souris C57BL/6J (groupe témoin négatif) indique le taux basal de TXB₂ présent. Le taux de TXB₂ des souris apoE^{-/-} non traitées est au moins deux fois supérieur à celui obtenu pour le témoin négatif.

Les souris apoE^{-/-} traitées au BM-573 présentent un taux de TXB₂ diminué par comparaison au témoin positif de l'expérience (p<0,05). Ainsi, le taux de TXB₂ pour ces souris a en effet chuté au même niveau que le taux de TXB₂ mesuré chez les souris du groupe témoin négatif. Le traitement à l'aspirine seule entraîne également une diminution significative de la concentration en TXB₂ plasmatique qui atteint alors le même niveau que le groupe témoin négatif. Pour terminer l'administration de l'aspirine et du BM-573 est aussi à l'origine d'une diminution de la concentration en TXB₂ dans le plasma mais cette diminution est similaire à celle obtenue après le traitement simple à l'aspirine ou au BM-573 (Figure 8).

b. Conclusion

Le BM-573 à 30-40 µg/jour/animal (2-2,6 mg/kg) diminue le taux de TXB₂ dans le sang au même niveau que le contrôle négatif. L'aspirine à 300-400 µg/jour/animal (20-26

mg/kg) diminue de manière similaire le taux de TXB₂ cependant aucun effet synergique n'est observé lorsqu'elle est administrée avec le BM-573.

III.2.1.3. Dosage des marqueurs de l'inflammation

Plusieurs molécules, marqueurs de l'inflammation, ont été dosées dans le plasma des souris. Dans un premier temps, nous avons dosé la MCP-1, un marqueur important de l'inflammation. Ensuite les molécules d'adhérence ICAM-1s et VCAM-1s ont été dosées. En effet, ces molécules sont exprimées par l'endothélium activé lors de la transmigration des monocytes et jouent un rôle important dans l'étape initiatrice de la formation des lésions athéromateuses. L'intérêt de doser ces molécules est de rendre compte des propriétés anti-inflammatoires du BM-573 et de l'aspirine.

a. Analyse des résultats pour MCP-1

Le graphe repris en figure 9 indique les moyennes des concentrations en MCP-1 obtenues dans les 5 groupes de souris.

La quantité de MCP-1 retrouvée dans le plasma des souris C57BL/6J se situe à 59 mg/mL et constitue le taux basal de MCP-1 produit chez les souris. Les souris du groupe témoin positif (souris apoE^{-/-} non traitées) montre un taux plasmatique de MCP-1 supérieur à celui observé pour les souris du témoin négatif.

Les souris apoE^{-/-} traitées au BM-573 possèdent, un taux plasmatique de MCP-1 moins élevé que les souris du témoin positif ($p < 0,05$) Cependant, le traitement à l'aspirine combiné ou non avec le BM-573 ne semble avoir aucun effet par comparaison au témoin positif.

b. Analyse des résultats pour ICAM-1

Le graphe repris en figure 10 indique les moyennes obtenues pour le dosage de ICAM-1s dans les échantillons de plasma de 5 groupes de souris.

Les résultats nous indiquent que le groupe témoin négatif constitué des souris C57BL/6J présente un taux plasmatique d'ICAM-1s plus faible que le témoin positif représenté par les souris apoE^{-/-} non traitées ($p < 0,05$).

Le traitement au BM-573 des souris apoE^{-/-} a pour conséquence une diminution hautement significative de la concentration en ICAM-1s dans le plasma par rapport au témoin positif ($p < 0,01$). Par contre, le groupe de souris apoE^{-/-} traité à l'aspirine ne présente pas de diminution aussi importante. Les souris traitées à la fois par le BM-573 et l'aspirine présentent une diminution significative de la concentration en ICAM-1s. Toutefois, cette diminution est moindre par comparaison aux valeurs de dosage obtenues pour les souris apoE^{-/-} traitées au BM-573 uniquement ($p < 0,05$).

c. Analyse des résultats pour VCAM-1

Le graphe repris en figure 11 indique les moyennes obtenues pour le dosage de VCAM-1 soluble dans les échantillons de plasma de 5 groupes de souris

La concentration en VCAM-1s est supérieure pour les souris apoE^{-/-} (témoin positif) en comparaison aux souris C57BL/6J (témoin négatif). Le graphe repris sur la figure 11 montre que la valeur moyenne de la concentration en VCAM-1s est 1,6 fois plus élevée pour les souris apoE^{-/-} par rapport aux souris C57BL/6J.

Une diminution significative ($p < 0,05$) du taux de VCAM-1s plasmatique est observée lorsque les souris apoE^{-/-} sont traitées au BM-573. Le taux plasmatique de VCAM-1s de ces souris se rapproche du taux obtenu chez les souris du groupe témoin négatif. Toutefois, cette diminution n'est pas observée lors du traitement à l'aspirine. L'administration de l'aspirine accompagnée du BM-573 ne réduit pas la concentration de VCAM-1s par rapport au témoin positif.

d. Conclusion

Le traitement au BM-573 à 30-40 µg/jour/animal (2-2,6 mg/kg) entraîne une diminution des taux plasmatiques de MCP-1, de ICAM-1s et de VCAM-1s. En revanche l'aspirine à 300-400 µg/jour/animal (20-26 mg/kg) n'est pas capable de diminuer les taux plasmatiques de ces molécules. Toutefois, l'administration combinée de l'aspirine et du BM-573 est en mesure de réduire le taux plasmatique de ICAM-1s.

III.2.2. Analyse des lésions athéromateuses

La seconde partie de l'étude des souris apoE^{-/-} porte sur l'analyse morphologique de l'aorte et permet de rendre compte de l'effet du traitement dans la progression des lésions athéromateuses.

L'analyse macroscopique de l'aorte par la méthode « en face » permet de quantifier l'étendue des lésions au niveau de la paroi de l'aorte et de montrer si le BM-573 et/ou l'aspirine sont capables de ralentir la progression des lésions lorsqu'ils sont administrés préventivement.

L'analyse en microscopie optique de coupes transversales de l'aorte rend compte de la composition des plaques d'athérome et de l'effet des médiateurs testés.

III.2.2.1. Quantification des plaques d'athérosclérose par la méthode « en face »

Les aortes de souris appartenant aux différents groupes étudiés ont été prélevées et colorées au Sudan IV. Ainsi, les plaques athéromateuses apparaissent en rouge et leur surface peut être dès lors quantifiée. La figure 12 montre des photographies des aortes ouvertes longitudinalement des différents groupes de souris.

Sur les photographies des aortes de souris apoE^{-/-} non traitées, on observe des plaques athéromateuses qui se trouvent, pour la plupart, au niveau de la crosse aortique et de ses embranchements. Des plaques athéromateuses en plus petit nombre et de plus petites tailles sont tout de même observées dans les parties thoracique et abdominale ainsi qu'au niveau de la bifurcation iliaque. Les souris traitées au BM-573 montrent des aortes présentant une quantité nettement plus faible de lésions athéromateuses. En général, et comme le montre la figure 12, très peu de plaques athéromateuses sont observées ; les seules révélées par la coloration sont alors principalement localisées au niveau d'un des embranchements de la crosse. L'aspirine semble également réduire le nombre de plaque, mais lorsqu'elle est combinée au BM-573, cette réduction semble plus importante.

La surface des plaques athéromateuses est calculée par rapport à la surface totale de l'aorte pour chaque souris. Le graphe de la figure 13 indique le pourcentage moyen pour chaque groupe de souris apoE^{-/-}. Ainsi, les souris apoE^{-/-} mâles non traitées à 15 semaines présentent des plaques athéromateuses sur 1,9 % de la surface totale de l'aorte. Une

diminution significative de la quantité de plaque est observée à la suite du traitement au BM-573, elles ne recouvrent plus que 0,6 % de la surface totale. Cette réduction de la quantité de plaques athéromateuses est également observée chez les souris traitées à l'aspirine, où les lésions athéromateuses recouvrent 0,9% de la surface totale de l'aorte. Si l'aspirine est combinée au BM-573, la quantité de plaques athéromateuse diminue en comparaison au témoin positif.

III.2.2.2. Analyse des coupes histologiques

Comme mentionné dans l'introduction, les artères sont constituées de trois tuniques morphologiquement distinctes, de l'intérieur vers l'extérieur du vaisseau : l'intima, la média et l'adventice.

Brièvement, rappelons que l'intima est principalement constituée, d'une monocouche de cellules endothéliales et d'une fine couche de tissu conjonctif. Soulignons cependant que dans les artères élastiques, l'intima, très épaisse, peut contenir des cellules musculaires lisses particulières dites myointimales. La média contient exclusivement des cellules musculaires lisses et des constituants extracellulaires. Dans les artères élastiques, la média est constituée de plusieurs lames élastiques concentriques entre lesquelles se trouvent les cellules musculaires lisses. Le nombre de ces lames élastiques est fonction du diamètre de l'artère. L'adventice est constituée en général de fibres de collagène. Elle contient également quelques fibres élastiques épaisses et des fibroblastes.

D'un point de vue histopathologique, la lésion athéromateuse débute par l'accumulation de lipides dans les cellules myointimales. Beaucoup de ces cellules deviennent alors vacuolaires et sont appelées cellules spumeuses ou « foam cells ». Ce stade se traduit par la strie lipidique. L'altération précoce est présentée par une zone épaissie de l'intima.

L'examen histologique à 15 semaines des aortes montre chez les souris apoE^{-/-} une média classique avec des fibres élastiques concentriques relativement bien organisées entre lesquelles on retrouve des cellules musculaires lisses irrégulières à l'aspect vacuolaire et qui présentent des noyaux irréguliers. La paroi des aortes de ces souris est différente de celle des aortes de souris C57BL/6J examinées au même moment (15 semaines). Les traitements à l'aspirine et/ou au BM-573 semblent améliorer cette structure ; la paroi est alors similaire à celle des C57BL/6J et présente des fibres élastiques concentriques entre lesquelles se trouvent des cellules musculaires lisses normales (Figure 14). La coloration spéciale à l'orcéine mettant en évidence les fibres élastiques montre que celles-ci sont bien présentes et d'aspect normal dans chaque aorte et ce, quel que soit le groupe étudié traité ou non (Figure 15). En revanche, la coloration *Oil red O*, une coloration spéciale qui révèle la présence de lipides en rouge, a permis de montrer chez les souris apoE^{-/-} une accumulation de lipides dans la région sous-endothéliale. La présence de lipides n'était pas observée lorsque les souris avaient été traitées à l'aspirine ou au BM-573 ou lors de la combinaison des deux traitements (Figure 16).

Si les photos de coupes histologiques présentées ici concernent la partie abdominale pour la coloration à l'H&E, thoracique pour la coloration à l'orcéine et la crosse aortique pour la coloration à l'ORO, soulignons toutefois que chaque zone de l'aorte (crosse, thoracique, abdominale) a été analysée au moyen de chaque coloration. Remarquons aussi, à 15 semaines, les principales lésions observées et décrites se situent au niveau de la crosse et la coloration ORO semble la plus appropriée à ce stade.

III.2.2.3. Conclusion

L'examen macroscopique de l'étendue des lésions a été en mesure de démontrer que l'aspirine à 300-400 µg/jour/animal (20-26 mg/kg) diminue significativement la quantité de lésions chez les souris apoE^{-/-}. Le BM-573 à 30-40 µg/jour/animal (2-2,6 mg/kg) semble toutefois plus efficace pour réduire l'étendue des lésions. L'administration des deux composés aboutit à une diminution de la quantité de plaques athéromateuse supérieure à celle obtenue après un traitement à l'aspirine seule.

L'examen microscopique de coupes transversales de l'aorte indique qu'après l'administration de l'aspirine, du BM-573 ou de la combinaison des deux traitements, la paroi aortique présente la structure d'une paroi artérielle saine. Les cellules musculaires lisses présentent une structure normale, régulière et aucune infiltration lipidique n'est observée.

III.2.3. Discussion de l'étude sur les souris athéromateuses

L'étude *in vivo* entreprise au cours de ce mémoire a pour objectif d'évaluer chez des souris apoE^{-/-}, l'effet d'un traitement à l'aspirine durant 9 semaines et de comparer celui-ci à un traitement au BM-573 ; enfin, l'impact de l'administration simultanée des deux traitements a également été investigué.

Par cette étude, nous souhaitons montrer non seulement au niveau des paramètres biochimiques, mais aussi au niveau macroscopique et microscopique, l'impact que peut avoir le traitement au BM-573, modulateur de la voie du TXA₂, lorsqu'il est administré seul et ce qu'il apporte par rapport au traitement à l'aspirine sur la progression des lésions.

Dans un premier temps, des dosages plasmatiques ont été réalisés pour évaluer les concentrations en lipides, en TXB₂ et en MCP-1, ICAM-1s et VCAM-1s, des marqueurs de l'inflammation très impliqués dans le développement des lésions.

Les dosages du cholestérol montrent que le groupe témoin négatif (C57BL/6J) se situe bien dans les valeurs de référence connues chez la souris (49-96 mg/dL).

Le groupe témoin positif montre quant à lui un taux nettement plus élevé en cholestérol total et en triglycéride. En effet, la déficience en apoprotéine E est à l'origine d'une perturbation du métabolisme des lipoprotéines. La délétion du gène codant pour l'apoprotéine E se traduit non seulement par une augmentation de la concentration en cholestérol plasmatique, mais également par une augmentation du cholestérol LDL dont la concentration est supérieure au cholestérol HDL; ce qui constitue un facteur favorisant la formation de lésions athéromateuses.

Le traitement au BM-573 seul ne produit aucun effet sur les concentrations en lipides plasmatiques. Ce modulateur de la voie du TXA₂ n'est pas supposé interagir dans le métabolisme des lipoprotéines. Ces résultats sont en accord avec ce qui a été démontré précédemment avec des souris RLDL^{-/-} pour lesquelles le traitement au BM-573 n'influait pas le métabolisme lipidique (Cyrus et al., 2007).

Contre toute attente, après le traitement de 9 semaines des souris apoE^{-/-} par l'aspirine, une augmentation des triglycérides et du cholestérol total est observée par comparaison aux souris du groupe témoin positif. Cette augmentation des triglycérides et du cholestérol plasmatique semble moindre lorsque l'aspirine est administrée avec le BM-573. Pourtant l'aspirine est un inhibiteur de la cyclooxygénase qui, en théorie, n'agit pas sur le métabolisme lipidique. Cette observation est assez déconcertante car plusieurs études ont déjà démontré

que l'aspirine n'influençait pas les concentrations plasmatiques en triglycérides et en cholestérol que ce soit dans le modèle de souris RLDL^{-/-} (Cyrus et al., 2002; Pratico et al., 2001) ou dans le modèle de souris apoE^{-/-} (Cayatte et al., 2000).

Les résultats des dosages du TXB₂ rendent compte de la production de thromboxane A₂, médiateur reconnu comme favorisant l'athérogenèse. Les souris apoE^{-/-} présentent un taux de TXB₂ supérieur aux souris du groupe témoin négatif (C57BL/6J). Le groupe témoin positif (apoE^{-/-} non traitées) réagit donc comme il était attendu par une augmentation plasmatique du TXA₂. Ce médiateur produit par les plaquettes, les macrophages et l'endothélium activé, participera à la formation des plaques d'athérome.

L'aspirine, par inhibition de la cyclooxygénase, l'enzyme responsable de la production de la prostaglandine H₂, diminue la production de TXA₂. Les résultats obtenus après un traitement à l'aspirine sont similaires à ceux retrouvés dans la littérature. Cyrus *et al* ont, en effet, démontré dans l'étude utilisant des souris RLDL^{-/-} que l'aspirine diminuait les taux plasmatique et urinaire de TXB₂ (Cyrus et al., 2002).

Une diminution de la concentration en TXA₂ lors du traitement au BM-573 est aussi observée et imputable à son activité inhibitrice de la thromboxane synthétase démontrée largement dans des études antérieures (Rolin et al., 2001). Cette diminution de la production de TXA₂ a également été démontrée très récemment chez des souris RLDL^{-/-}, où le traitement le BM-573 était aussi à l'origine d'une diminution des taux de TXB₂ plasmatique et urinaire (Cyrus et al., 2007).

La combinaison des deux traitements ne montre pas d'effet synergique sur la diminution de la concentration en TXB₂. Si l'administration des deux traitements diminue le taux de TXB₂, cette diminution n'est pas supérieure à celle observée lors d'un traitement à l'aspirine ou BM-573 seul. Des études réalisées avec le térutroban (S-18886), un antagoniste du récepteur du TXA₂ développé par la firme Servier et actuellement en phase III clinique, montrent que cette molécule (5 mg/kg/jour) est capable de diminuer le taux de TXB₂ des souris apoE^{-/-} et expliquent cette diminution par l'interruption du *feedback positif* exercé sur la production de TXA₂ par les plaquettes qui est modulée par le récepteur TP (Cayatte et al., 2000). En conclusion, le BM-573 est capable, par ses propriétés inhibitrices de la thromboxane synthétase, de diminuer la production de thromboxane A₂ de manière efficace et avec une activité similaire à celle de l'aspirine. Par ses propriétés antagonistes du récepteur TP, il peut, contrairement à l'aspirine, empêcher l'effet d'autres prostaglandines agonistes du récepteur TP tel la PGH₂ et le 8-*iso*-PGF_{2α}.

Les dosages de MCP-1, d'ICAM-1s et de VCAM-1s mettent en évidence les propriétés anti-inflammatoires du BM-573 et de l'aspirine. Le dosage de la MCP-1 indique une augmentation du taux MCP-1 dans le plasma des souris apoE^{-/-}. L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire qui trouve son origine dans l'augmentation de la production de molécules proinflammatoires telles la chémokine MCP-1. Une diminution du taux de MCP-1 plasmatique est observée chez les souris traitées au BM-573. Un antagoniste de référence du récepteur TP, le SQ29548, a déjà démontré sa capacité à diminuer la production de MCP-1 par les cellules HUVECs en culture (Ishizuka et al., 2000). De plus, ce même antagoniste est capable de diminuer le taux plasmatique de MCP-1 chez les souris apoE^{-/-} auxquelles a été administré l'isoprostane 8-*iso*-PGF_{2α} (Ishizuka et al., 2000; Tang et al., 2005). Le BM-573, en tant qu'antagoniste du récepteur TP, serait donc également capable de diminuer la production de la chémokine MCP-1 tout comme le SQ-29548. L'aspirine quant à elle, qu'elle soit administrée seule ou en présence du BM-573, ne semble pas avoir d'effet sur la concentration en MCP-1. Soulignons par ailleurs, qu'il est démontré que dans le modèle de souris RLDL^{-/-}, que l'aspirine (3-4 mg/kg/jour) est capable de diminuer le taux de MCP-1 plasmatique (Cyrus

et al., 2002). De plus, l'indométhacine, un autre anti-inflammatoire non stéroïdien, diminue également la production de MCP-1 chez les souris RLDL^{-/-} (Pratico et al., 2001). Les résultats obtenus dans cette étude avec des souris apoE^{-/-} montrent que l'aspirine n'aurait pas d'effet sur la concentration en MCP-1. Ajoutons qu'aucun effet du BM-573 n'est observé lorsqu'il est administré avec l'aspirine.

Les résultats des dosages d'ICAM-1s indiquent que les souris du groupe témoin positif présentent un taux d'ICAM-1s dans le sang supérieur à celui observé chez les souris du groupe témoin négatif (C57BL/6J). En effet, les souris apoE^{-/-} développent spontanément de l'athérosclérose. Durant les étapes initiatrices de la formation des lésions, il se produit une augmentation de l'expression de molécules d'adhérence, dont ICAM-1, favorisant l'accumulation des monocytes dans l'intima. La diminution du taux plasmatique d'ICAM-1s soluble après un traitement au BM-573 est attribuable à ses propriétés antagonistes du récepteur TP. Il a également été démontré que le S-18886 pouvait diminuer la production de ICAM-1s chez les souris apoE^{-/-} (Cayatte et al., 2000). Il semble donc que l'antagonisme du récepteur TP exerce un effet protecteur dans l'initiation des lésions athéromateuses par la réduction de l'expression d'ICAM-1 au niveau de l'endothélium. Il serait dès lors possible que l'effet protecteur du BM-573 s'exerce notamment lors de l'accumulation des monocytes dans l'intima. L'aspirine, par contre, ne diminue pas de manière significative le taux d'ICAM-1s. Cayatte *et al* ont démontré précédemment que l'aspirine à 30 mg/kg/jour n'était pas capable de réduire de manière significative le taux de ICAM-1s dans le plasma des souris apoE^{-/-}. Si l'aspirine est à l'origine d'une diminution de la production des eicosanoïdes, d'autres médiateurs capables d'interagir avec le récepteur TP, tels les isoprostanes de type F₂, restent présents. C'est pourquoi un antagoniste du récepteur TP reste plus efficace pour inhiber la production d'ICAM-1s car il prévient l'action de tous les ligands capables d'interagir avec le récepteur TP (Cayatte et al., 2000). Toutefois, d'autres expériences menées sur les souris RLDL^{-/-} ont montré que l'aspirine à 3-4 mg/Kg/jour diminuait ICAM-1s pour le contrôle positif (Cyrus et al., 2002). Le sujet est encore très controversé actuellement. En effet, les modèles utilisés sont complexes, les taux d'ICAM-1s retrouvés varient d'un modèle à l'autre ; il est donc difficile de situer le niveau d'action de l'aspirine pour chacun d'entre eux.

Le dernier marqueur de l'inflammation dosé dans le plasma est VCAM-1s. Les résultats indiquent que les témoins positifs et négatifs réagissent conformément à nos attentes, les souris apoE^{-/-} présentent un taux plus élevé de VCAM-1s. Le BM-573 est capable de diminuer la production de VCAM-1s. Plusieurs données obtenues à partir de manipulations effectuées sur cellules HUVECs en culture ont démontré qu'un antagoniste de référence du récepteur TP (SQ-29548) était à l'origine d'une diminution de l'expression de la molécule en surface des cellules (Ishizuka et al., 1998; Leitinger et al., 2001). Les résultats obtenus pour les manipulations *in vivo* renforcent donc l'hypothèse de l'action du BM-573 sur l'activation endothéliale et en conséquence sur l'étape initiatrice de la lésion.

L'efficacité des traitements a été évaluée par le développement des plaques athéromateuses situées au niveau de l'aorte des souris apoE^{-/-} mâles de 15 semaines. Les résultats indiquent, comme stipulé dans la littérature, que les souris apoE^{-/-} développent une athérosclérose spontanée.

Le traitement à l'aspirine (300-400 µg/jour/animal) réduit de manière significative la quantité de lésions athéromateuses ($0,9 \pm 0,6$ % contre $1,9 \pm 0,1$ %). De la même manière, des études menées sur des souris RLDL^{-/-} ont démontré une diminution significative de la quantité de plaques athéromateuses chez les souris traitées à l'aspirine 3-4 mg/kg/jour par rapport aux souris non traitées (Cyrus et al., 2002).

La quantité de plaques athéromateuses est également diminuée de manière significative par l'antagoniste du récepteur TP, le BM-573 ($0,6 \pm 0,4$ % contre $1,9 \pm 0,1$ %). En effet, la liaison d'un agoniste sur le récepteur TP favorise les processus inflammatoires, l'agrégation plaquettaire et la vasoconstriction. Il a déjà été démontré dans un modèle de souris apoE^{-/-} qu'une déficience pour ce récepteur était à l'origine d'une diminution de la quantité de plaques athéromateuses sur la paroi de l'aorte (Kobayashi et al., 2004). C'est pourquoi le fait de bloquer ce même récepteur par un antagoniste permet de diminuer la quantité de plaques athéromateuses. En effet, le BM-573 est en mesure de diminuer la quantité de lésions athéromateuses dans le modèle de souris apoE^{-/-} mais également dans le modèle de souris RLDL^{-/-}, comme démontré très récemment. Les résultats de cette étude menée sur les souris RLDL^{-/-} montrent une diminution significative de la surface des lésions athéromateuses au niveau des aortes de souris traitées au BM-573 (Cyrus et al., 2007). Il a été également démontré que le S-18886 administré à des souris apoE^{-/-} réduisait significativement la taille moyenne des lésions (Cayatte et al., 2000).

L'administration combinée de l'aspirine et du BM-573 réduit aussi l'athérosclérose chez les souris apoE^{-/-} dans la même mesure que le BM-573 administré seul. L'intérêt d'ajouter le BM-573 est de neutraliser les propriétés délétères de molécules telles la PGH₂ ou le 8-iso-PGF_{2α}, agonistes du récepteurs TP et très impliqués dans l'athérogenèse. Aucun effet synergique des deux composés n'est observé sur la progression des lésions. L'aspirine, bien qu'elle soit capable de diminuer l'étendue des lésions, est un inhibiteur des cyclooxygénases qui limite la production du thromboxane A₂ sans influencer la production des isoprostanes dont les mécanismes de formation sont indépendants des cyclooxygénases. Dès lors, les isoprostanes peuvent interagir avec le récepteur TP et entraîner l'activation endothéliale, la contraction de la musculature lisse ou encore l'agrégation plaquettaire de manière similaire au thromboxane A₂. Le BM-573, par son activité double, est plus efficace que l'aspirine pour réduire l'étendue des lésions athéromateuses. En effet, ce composé est un inhibiteur de la thromboxane synthétase entraînant une accumulation de l'endoperoxyde PGH₂ qui peut dès lors servir de substrat à la prostacycline synthétase. De plus l'antagonisme du récepteur TP prévient l'action de tout autre agoniste du récepteur TP tel que la PGH₂ et les isoprostanes, dont la production n'est pas limitée par un traitement à l'aspirine.

L'examen histologique des aortes a permis de visualiser les plaques et l'organisation de la paroi aortique. Si les coupes histopathologiques du groupe témoin positif montrent une structure organisée des lames d'élastine, certaines cellules musculaires lisses entre ces lames peuvent présenter, en revanche, un aspect vacuolaire et irrégulier suggérant des remaniements de la média. La coloration des lipides à l'*Oil Red O* met en évidence une accumulation lipidique dans l'intima de la paroi aortique du contrôle positif. En effet, l'accumulation des LDL au sein de l'intima se déroule dès la 3^{ème} semaine chez les souris apoE^{-/-} (Tamminen et al., 1999). Les premières stries lipidiques apparaissent à l'âge de trois mois. A la 15^{ème} semaine, des lésions intermédiaires sont observées, elles sont essentiellement composées d'une accumulation de cellules spumeuses avec un début de migration des cellules musculaires lisses vers l'intima. Le stade de la plaque athéromateuse proprement dite n'apparaît qu'à la 20^{ème} semaine avec la formation d'une chape fibreuse (Meir and Leitersdorf, 2004).

Les souris traitées à l'aspirine ou au BM-573 combiné ou non à l'aspirine ne présentent pas d'accumulation lipidique dans la couche sous-endothéliale de la paroi aortique, la structure des cellules musculaires lisses est semblable à celle du contrôle négatif. Les études précédentes menées sur les souris RLDL^{-/-} de 20 semaines traitées au BM-573 ont démontré que les coupes transversales des aortes présentaient une diminution significative de la taille des lésions. De plus le BM-573 a établi dans cette étude sa capacité à diminuer la

proportion relative en macrophages et à augmenter celle en cellules musculaires lisses et en collagène; ce qui renforce l'hypothèse du rôle anti-inflammatoire du BM-573 (Cyrus et al., 2007). Cyrus et al ont également démontré précédemment que l'aspirine réduisait l'étendue des lésions sur l'aorte en coupe transversale. L'aspirine y diminuait également les proportions en macrophages au sein des lésions mais augmentait les proportions de cellules musculaires lisses et de collagène (Cyrus et al., 2002).

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'athérosclérose est une pathologie multifactorielle à l'origine des maladies cardiovasculaires responsables de la cause majeure de mortalité dans les sociétés industrialisées. C'est une pathologie inflammatoire qui trouve son origine dans l'accumulation de LDL et par la suite de monocytes au sein de l'intima de la paroi artérielle. De nombreux médiateurs influencent la progression des plaques d'athérome; parmi ceux-ci le thromboxane A_2 . Le thromboxane A_2 est un prostanoïde de la série 2 issu du métabolisme de l'acide arachidonique par les cyclooxygénases. Ce médiateur cellulaire interagit avec le récepteur TP pour exercer son activité telle que la contraction de la musculature lisse vasculaire et bronchique, l'induction de l'agrégation plaquettaire mais également l'activation endothéliale. En raison de ces propriétés, le thromboxane A_2 favorise la formation des lésions athéromateuses. En effet, il peut activer l'endothélium qui en conséquence exprime les molécules d'adhérence nécessaires à la transmigration des monocytes, l'étape initiatrice de l'athérosclérose.

Dans le cadre de ce mémoire, notre intérêt s'est donc porté sur l'effet potentiel de modulateurs de la voie du thromboxane A_2 qui possèderaient un effet protecteur dans la pathologie athéromateuse. Ainsi le BM-573, un dérivé du torasémide, possède une activité double, il est à la fois antagoniste du récepteur TP et inhibiteur de la thromboxane synthétase. Cet antagoniste possède une forte affinité pour le récepteur TP et ses propriétés antiagrégantes et myorelaxantes ont été largement démontrées (Rolin et al., 2001). Le BM-573 s'est également révélé prévenir partiellement l'infarctus du myocarde induit par une solution de chlorure ferrique chez le porc (Rolin et al., 2003). De plus il a récemment été montré que le BM-573 était en mesure de diminuer la progression des lésions athéromateuses dans le modèle de souris RLDL^{-/-} (Cyrus et al., 2007) et de prévenir les effets du 8-*iso*-PGF_{2α} (Rolin et al., 2007, in press).

Ainsi, ce modulateur synthétisé au laboratoire a été investigué sur deux autres types de modèles : un modèle *in vitro* de cellules endothéliales en culture et un modèle *in vivo* de souris *knock-out* pour le gène codant pour l'apoprotéine E.

Dans un premier temps les agonistes U-46619 et 8-*iso*-PGF_{2α} du récepteur TP ainsi que les antagonistes SQ-29548 et BM-573 du récepteur TP ont été investigués sur la lignée cellulaire EAhy926. L'objectif des manipulations était de mettre en évidence l'effet potentiel du BM-573 sur l'expression de molécules d'adhérence et de chémokines. Le modèle murin d'athérosclérose a permis dans un second temps d'évaluer l'activité de l'aspirine par rapport au BM-573 et d'investiguer un éventuel effet synergique des deux composés sur la progression des lésions athéromateuses ainsi que sur les concentrations plasmatiques en lipides, en TXB₂, en ICAM-1, VCAM-1 et MCP-1.

La première partie des résultats obtenus sur cellules endothéliales a révélé que les cellules EAhy926 étaient insensibles aux agonistes du récepteur TP qui se sont avérés inefficaces pour augmenter la production d'ICAM-1 et de MCP-1. De plus, si l'antagoniste du récepteur TP, le SQ-29548 diminue la production de MCP-1 induite par le TNFα, le BM-573 reste en revanche sans effet. Or, il est décrit que les agonistes du récepteur TP ainsi que le SQ-29548 produisaient un effet sur les cellules HUVECs dont est issue la lignée EAhy926 (Ishizuka et al., 1998; Ishizuka et al., 2000; Ishizuka et al., 1996). C'est pourquoi nous avons émis l'hypothèse que la fusion de la cellule HUVEC avec la cellule A549 aurait entraîné la perte du récepteur TP sur les cellules EAhy926.

Un *western blot* a dès lors été envisagé pour mettre en évidence la présence ou non du récepteur, mais malheureusement les résultats sont inutilisables. Les derniers résultats du *western blot* effectué n'ont pas mis en évidence la présence du récepteur TP sur un lysat de plaquettes considéré comme contrôle positif. Nous en avons donc déduit que la protéine ne se trouvait pas dans les lysats cellulaires réalisés. Ainsi, il nous semble opportun de modifier la composition du tampon de lyse pour permettre l'extraction du récepteur TP qui est une protéine membranaire. Le détergent neutre du tampon de lyse qui était le Triton X100 doit être remplacé par un détergent plus puissant, tel l'urée, en mesure d'extraire une protéine possédant plusieurs domaines hydrophobes.

Si les résultats du *western blot* confirment l'absence du récepteur TP, il faut dès lors changer de type cellulaire. Le type cellulaire qui pourrait être utilisé pour déterminer l'implication du BM-573 dans l'activation endothéliale serait les cellules HUVECs. Les effets des agonistes et antagonistes du récepteur TP ont été largement démontrés sur cette souche de cellules. En effet, c'est sur ce type cellulaire que le U-46619 est capable d'induire l'expression des molécules d'adhérence (Ishizuka et al., 1996). Le 8-*iso*-PGF_{2α} est également en mesure d'augmenter l'adhérence des monocytes sur ces mêmes cellules (Leitinger et al., 2001). Finalement, ce sont les HUVECs qui ont permis la démonstration de la capacité du tétrtroban à diminuer l'expression de ICAM-1 (Cayatte et al., 2000).

Le BM-573 pourrait donc être investigué sur ce type cellulaire afin d'évaluer l'expression au niveau protéique d'ICAM-1 de VCAM-1 et de MCP-1 par ELISA de surface ou encore au niveau de l'ARN messager par RT-PCR en temps réel. Un test d'adhérence des monocytes sur ces cellules endothéliales pourrait également être réalisé afin de démontrer l'implication du BM-573 dans l'initiation de la lésion athéromateuse.

La seconde partie de ce mémoire visait à investiguer l'effet de l'aspirine sur la progression des lésions athéromateuses chez la souris apoE^{-/-}, et de comparer cet effet à celui du BM-573 ainsi qu'à celui de l'association des deux composés.

Cette étude nous a permis de démontrer que l'aspirine réduisait la production de thromboxane A₂ et l'étendue des lésions athéromateuses sur l'aorte. Précédemment, l'étude de Cyrus et al. avait déjà établi que l'aspirine diminuait la quantité des lésions chez les souris RLDL^{-/-} (Cyrus et al., 2002). Toutefois, l'aspirine n'a pas eu d'impact sur les concentrations en VCAM-1 soluble et en MCP-1, suggérant alors que celle-ci exerçait un effet limité sur l'activation endothéliale.

Toutefois le BM-573, contrairement à l'aspirine, est capable de réduire les concentrations plasmatiques de ces marqueurs de l'inflammation. Ce médiateur à la structure originale réduit la production de thromboxane A₂ et s'est avéré plus efficace que l'aspirine dans la prévention des lésions athéromateuses. Ce composé possède, en effet, une double activité; c'est un inhibiteur de la thromboxane synthétase et un puissant antagoniste du récepteur TP. Ainsi, à l'inverse de l'aspirine, il possède des propriétés anti-inflammatoires imputables à cette capacité à bloquer le récepteur TP. Le BM-573 exercerait son action lors de l'initiation des lésions athéromateuses en limitant l'activation endothéliale. En effet, si l'aspirine diminue le taux de thromboxane A₂, elle n'influence pas la production des isoprostanes. Ces agonistes du récepteur TP sont issus d'un mécanisme de peroxydation non enzymatique de l'acide arachidonique ; ils sont donc indépendants des cyclooxygénases et insensibles à l'aspirine. Aussi l'antagonisme du récepteur TP permet de neutraliser l'action des autres agonistes du récepteur TP parmi lesquels la PGH₂ et les isoprostanes. C'est pourquoi, l'administration de l'aspirine combinée au BM-573 s'est révélée plus efficace dans la réduction de l'étendue des lésions ainsi que la diminution de la production d'ICAM-1 soluble.

Cette étude *in vivo* a été réalisée comme le préambule d'expérimentations futures qui seront en mesure d'apporter des précisions quant aux rôles du BM-573. En effet, ces expériences devraient être renouvelées pour des groupes de souris comprenant un nombre plus élevé d'individus notamment pour l'examen microscopique des lésions.

Les perspectives envisagées dans le cadre des expérimentations *in vivo* seraient d'investiguer l'effet des deux traitements à plus long terme, comme par exemple sur des souris âgées de 26 semaines. De plus, il serait intéressant de pratiquer des analyses microscopiques plus poussées, pour évaluer d'un point de vue quantitatif la composition des lésions après un traitement avec un modulateur du thromboxane A₂. En effet sur le modèle de souris RLDL^{-/-}, la quantité relative de macrophages, de cellules musculaires lisses et de collagène a été calculée après un marquage en immunocytochimie. Ainsi le BM-573 diminuait la proportion de macrophage au sein des lésions mais augmentait la proportion en cellules musculaires lisses et collagène (Cyrus et al., 2007). Ce type d'expérience reproduite sur le modèle de souris apoE^{-/-} pourrait confirmer l'effet du BM-573 sur la constitution des lésions athéromateuses. Cela permettrait également d'investiguer le rôle de l'aspirine sur la composante inflammatoire par l'évaluation de la proportion en macrophage au sein des lésions. Un marquage spécifique des LDL oxydés est aussi envisagé et pourrait apporter des informations très intéressantes. De plus, ces expériences menées en parallèle avec les manipulations sur un modèle de cellules endothéliales en culture permettraient de renforcer le rôle anti-inflammatoire d'un antagoniste du récepteur TP.

Les propriétés du BM-573 pourraient également être investiguées sur la néoangionénèse qui représente l'une des complications de la pathologie athéromateuse. En effet, le BM-573 a déjà démontré sa capacité à inhiber la migration des cellules HUVECs induite par le facteur de croissance VEGF ainsi que la néovascularisation d'anneaux d'aorte de rat (de Leval et al., 2006). Ce rôle pourrait dès lors être investigué chez les souris apoE^{-/-}.

En conclusion, si les manipulations effectuées sur cellules endothéliales n'ont pas été en mesure de montrer les effets du BM-573 sur l'athérogenèse, elles ont pu mettre en évidence que le modèle de cellules EAhy926 n'était pas approprié pour ce type d'étude. Par contre, le modèle de souris apoE^{-/-} a mis en lumière que l'aspirine semble moins efficace que le BM-573 dans la protection contre l'athérosclérose. Cependant une administration combinée avec le BM-573 améliore la diminution de l'étendue des lésions athéromateuses.

Le BM-573 se révèle ainsi un candidat prometteur pour la prévention de l'athérosclérose en limitant la production de thromboxane A₂ et en neutralisant les effets proathérogéniques liés aux récepteurs TP.

V. BIBLIOGRAPHIE

Bourdillon, M. C., Poston, R. N., Covacho, C., Chignier, E., Bricca, G., and McGregor, J. L. (2000). ICAM-1 deficiency reduces atherosclerotic lesions in double-knockout mice (ApoE(-/-)/ICAM-1(-/-)) fed a fat or a chow diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2630-2635.

Breslow, J. L. (1996). Mouse models of atherosclerosis. *Science* 272, 685-688.

Brousseau, M. E., and Hoeg, J. M. (1999). Transgenic rabbits as models for atherosclerosis research. *J Lipid Res* 40, 365-375.

Cayatte, A. J., Du, Y., Oliver-Krasinski, J., Lavielle, G., Verbeuren, T. J., and Cohen, R. A. (2000). The thromboxane receptor antagonist S18886 but not aspirin inhibits atherogenesis in apo E-deficient mice: evidence that eicosanoids other than thromboxane contribute to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1724-1728.

Cotran, R. S., and Mayadas-Norton, T. (1998). Endothelial adhesion molecules in health and disease. *Pathol Biol (Paris)* 46, 164-170.

Cracowski, J. L., Berdeaux, O., and Durand, T. (2005). [Isoprostanes, biomarkers of lipid peroxidation in humans. Part 3: Biomarkers and mediators in vascular physiology and disease]. *Pathol Biol (Paris)* 53, 364-368.

Cranshaw, J. H., Evans, T. W., and Mitchell, J. A. (2001). Characterization of the effects of isoprostanes on platelet aggregation in human whole blood. *Br J Pharmacol* 132, 1699-1706.

Cyrus, T., Pratico, D., Zhao, L., Witztum, J. L., Rader, D. J., Rokach, J., FitzGerald, G. A., and Funk, C. D. (2001). Absence of 12/15-lipoxygenase expression decreases lipid peroxidation and atherogenesis in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation* 103, 2277-2282.

Cyrus, T., Sung, S., Zhao, L., Funk, C. D., Tang, S., and Pratico, D. (2002). Effect of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability, and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 106, 1282-1287.

Cyrus, T., Yao, Y., Ding, T., Dogne, J. M., and Pratico, D. (2007). A novel thromboxane receptor antagonist and synthase inhibitor, BM-573, reduces development and progression of atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. *Eur J Pharmacol* 561, 105-111.

Cyrus, T., Yao, Y., Ding, T., Dogne, J. M., and Pratico, D. (2007). Thromboxane receptor blockade improves the antiatherogenic effect of thromboxane A2 suppression in LDLR KO mice. *Blood* 109, 3291-3296.

Cyrus, T., Yao, Y., Rokach, J., Tang, L. X., and Pratico, D. (2003). Vitamin E reduces progression of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice with established vascular lesions. *Circulation* 107, 521-523.

de Leval, X., Dassel, T., Dogne, J. M., Waltregny, D., Bellahcene, A., Benoit, V., Pirotte, B., and Castronovo, V. (2006). Evaluation of original dual thromboxane A2 modulators as antiangiogenic agents. *J Pharmacol Exp Ther* 318, 1057-1067.

- Dogné, J. M., de Leval, X., Delarge, J., David, J. L., and Masereel, B. (2000). New trends in thromboxane and prostacyclin modulators. *Curr Med Chem* 7, 609-628.
- Dogné, J. M., de Leval, X., Kolh, P., Sanna, V., Rolin, S., Michaux, C., Mauer, M., David, J. L., Masereel, B., and Pirotte, B. (2003). Pharmacological evaluation of the novel thromboxane modulator BM-567 (I/II). Effects of BM-567 on platelet function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68, 49-54.
- Dogné, J. M., Hanson, J., de Leval, X., Kolh, P., Tchana-Sato, V., de Leval, L., Rolin, S., Ghuysen, A., Segers, P., Lambermont, B., *et al.* (2004). Pharmacological characterization of N-tert-butyl-N'-[2-(4'-methylphenylamino)-5-nitrobenzenesulfonyl]urea (BM-573), a novel thromboxane A₂ receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor in a rat model of arterial thrombosis and its effects on bleeding time. *J Pharmacol Exp Ther* 309, 498-505.
- Dogné, J. M., Rolin, S., de Leval, X., Benoit, P., Neven, P., Delarge, J., Kolh, P., Damas, J., David, J. L., and Masereel, B. (2001). Pharmacology of the thromboxane receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor BM-531. *Cardiovasc Drug Rev* 19, 87-96.
- Egan, K.M., Wang, M., Lucitt, M.B., Zukas, A.M., Puré, E., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A. (2005). Plaque destabilization by cyclooxygenase-2 inhibition combined with thromboxane receptor antagonism. *Circulation* 111, 334-342.
- Fan, J., and Watanabe, T. (2003). Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 10, 63-71.
- Fitzgerald, D. J., Frassetto, J., and FitzGerald, G. A. (1988). Prostaglandin endoperoxides modulate the response to thromboxane synthase inhibition during coronary thrombosis. *J Clin Invest* 82, 1708-1713.
- Fukunaga, M., Makita, N., Roberts, L. J., 2nd, Morrow, J. D., Takahashi, K., and Badr, K. F. (1993). Evidence for the existence of F₂-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 264, C1619-1624.
- George, J., Afek, A., Shaish, A., Levkovitz, H., Bloom, N., Cyrus, T., Zhao, L., Funk, C. D., Sigal, E., and Harats, D. (2001). 12/15-Lipoxygenase gene disruption attenuates atherogenesis in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* 104, 1646-1650.
- Gimbrone, M. A., Jr. (1999). Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol* 155, 1-5.
- Glass, C. K., and Witztum, J. L. (2001). Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104, 503-516.
- Hamberg, M., Svensson, J., and Samuelsson, B. (1975). Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 2994-2998.
- Hansson, G. K. (2005). Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352, 1685-1695.

- Hedberg, A., Hall, S. E., Ogletree, M. L., Harris, D. N., and Liu, E. C. (1988). Characterization of [5,6-3H]SQ 29,548 as a high affinity radioligand, binding to thromboxane A₂/prostaglandin H₂-receptors in human platelets. *J Pharmacol Exp Ther* 245, 786-792.
- Huang, J. S., Ramamurthy, S. K., Lin, X., and Le Breton, G. C. (2004). Cell signalling through thromboxane A₂ receptors. *Cell Signal* 16, 521-533.
- Ishizuka, T., Kawakami, M., Hidaka, T., Matsuki, Y., Takamizawa, M., Suzuki, K., Kurita, A., and Nakamura, H. (1998). Stimulation with thromboxane A₂ (TXA₂) receptor agonist enhances ICAM-1, VCAM-1 or ELAM-1 expression by human vascular endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 112, 464-470.
- Ishizuka, T., Sawada, S., Sugama, K., and Kurita, A. (2000). Thromboxane A₂ (TXA₂) receptor blockade suppresses monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression by stimulated vascular endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 120, 71-78.
- Ishizuka, T., Suzuki, K., Kawakami, M., Hidaka, T., Matsuki, Y., and Nakamura, H. (1996). Thromboxane A₂ receptor blockade suppresses intercellular adhesion molecule-1 expression by stimulated vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 312, 367-377.
- Ishizuka, T., Suzuki, K., Kawakami, M., Kawaguchi, Y., Hidaka, T., Matsuki, Y., and Nakamura, H. (1994). DP-1904, a specific inhibitor of thromboxane A₂ synthesizing enzyme, suppresses ICAM-1 expression by stimulated vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 262, 113-123.
- Jawien, J., Nastalek, P., and Korbut, R. (2004). Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 55, 503-517.
- Kobayashi, T., Tahara, Y., Matsumoto, M., Iguchi, M., Sano, H., Murayama, T., Arai, H., Oida, H., Yurugi-Kobayashi, T., Yamashita, J. K., *et al.* (2004). Roles of thromboxane A₂ and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 114, 784-794.
- Kumar, A., Kingdon, E., and Norman, J. (2005). The isoprostane 8-iso-PGF₂α suppresses monocyte adhesion to human microvascular endothelial cells via two independent mechanisms. *Faseb J* 19, 443-445.
- Leitinger, N., Huber, J., Rizza, C., Mechtcheriakova, D., Bochkov, V., Koshelnick, Y., Berliner, J. A., and Binder, B. R. (2001). The isoprostane 8-iso-PGF₂α stimulates endothelial cells to bind monocytes: differences from thromboxane-mediated endothelial activation. *Faseb J* 15, 1254-1256.
- Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241.
- Masereel, B., Damas, J., Fontaine, J., Lembeges, M., Lacan, F., Nuhric, A., Delarge, J., Pochet, L., Dogné, J.M. (1999). Thromboxane A₂ receptor antagonism in man and rat by a sulphonylcyanoguanidine (BM-144) and a sulphonylurea (BM-500). *J Pharm Pharmacol* 51, 695-701.
- Meir, K. S., and Leitersdorf, E. (2004). Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1006-1014.

- Michiels, C. (2003). Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* 196, 430-443.
- Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L., and Ross, R. (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14, 133-140.
- Narayanaswamy, M., Wright, K. C., and Kandarpa, K. (2000). Animal models for atherosclerosis, restenosis, and endovascular graft research. *J Vasc Interv Radiol* 11, 5-17.
- Offermanns, S., Toombs, C. F., Hu, Y. H., and Simon, M. I. (1997). Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. *Nature* 389, 183-186.
- Patrino, C., and FitzGerald, G. A. (1997). Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2309-2315.
- Pratico, D., Tillmann, C., Zhang, Z. B., Li, H., and FitzGerald, G. A. (2001). Acceleration of atherogenesis by COX-1-dependent prostanoid formation in low density lipoprotein receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3358-3363.
- Rolin, S., Dogne, J. M., Michaux, C., Delarge, J., and Masereel, B. (2001). Activity of a novel dual thromboxane A₂ receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor (BM-573) on platelet function and isolated smooth muscles. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 65, 67-72.
- Rolin, S., Hanson, J., Vastersaegher, C., Cherdon, C., Dogné, JM., Masereel B (2007). BM-520, an original TXA₂ modulator, inhibits action of thromboxane A₂ and 8-iso-prostaglandin F_{2α} *in vitro* and *in vivo* on human and rodent platelets and on smooth muscles from rodents. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, in press
- Rolin, S., Petein, M., Tchana-Sato, V., Dogne, J. M., Benoit, P., Lambermont, B., Ghuysen, A., Kolh, P., and Masereel, B. (2003). BM-573, a dual thromboxane synthase inhibitor and thromboxane receptor antagonist, prevents pig myocardial infarction induced by coronary thrombosis. *J Pharmacol Exp Ther* 306, 59-65.
- Tamminen, M., Mottino, G., Qiao, J. H., Breslow, J. L., and Frank, J. S. (1999). Ultrastructure of early lipid accumulation in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 847-853.
- Tang, M., Cyrus, T., Yao, Y., Vocun, L., and Pratico, D. (2005). Involvement of thromboxane receptor in the proatherogenic effect of isoprostane F_{2α}-III: evidence from apolipoprotein E- and LDL receptor-deficient mice. *Circulation* 112, 2867-2874.
- Tangirala, R. K., Rubin, E. M., and Palinski, W. (1995). Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res* 36, 2320-2328.
- Ullrich, V., Zou, M. H., and Bachschmid, M. (2001). New physiological and pathophysiological aspects on the thromboxane A₂-prostacyclin regulatory system. *Biochim Biophys Acta* 1532, 1-14.

Vanhoutte, P. M. (2002). [Endothelial dysfunction and vascular disease]. Journ Annu Diabetol Hotel Dieu, 1-15.

Verbeuren, T. J. (2006). [Terutroban and endothelial TP receptors in atherogenesis]. Med Sci (Paris) 22, 437-443.

I. INTRODUCTION

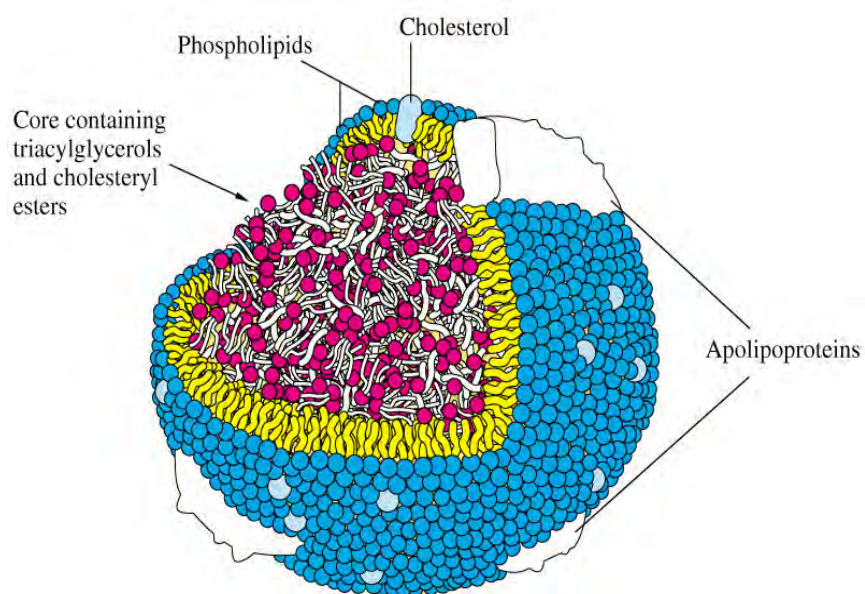


Figure 1: Structure d'une lipoprotéine. Les phospholipides se trouvent en surface de la lipoprotéine. Le cœur de la lipoprotéine est constitué de triglycérides et d'esters de cholestérol. Les apoprotéines sont intégrées dans la couche de phospholipides.

(<http://www.uwsp.edu/chemistry/tzamis/ch260/lipoprotein.jpg>)

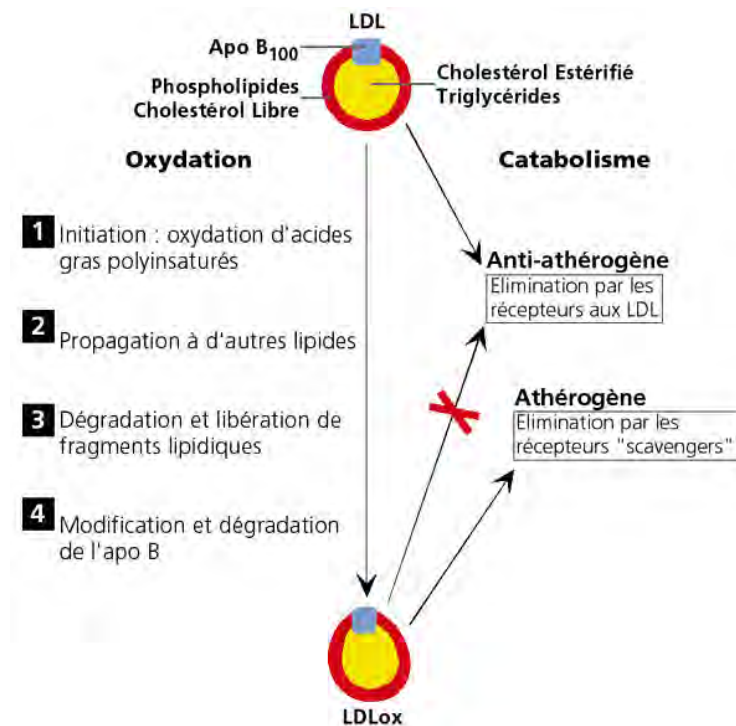


Figure 2: Oxydation des LDL. La première étape d'oxydation des LDL est l'oxydation des acides gras polyinsaturés : des hydroperoxydes sont alors formés (1). L'oxydation se propage aux autres lipides (2). Les fragments de lipides (malonaldéhydes) libérés (3) attaquent l'apoprotéine B100 (4). L'apoB100 n'est plus reconnue par le récepteur aux LDL mais par les récepteurs éboueurs (récepteurs *scavenger*). (Leoni J., <http://www.123bio.net/revues/jleoni/2chap2.html>)

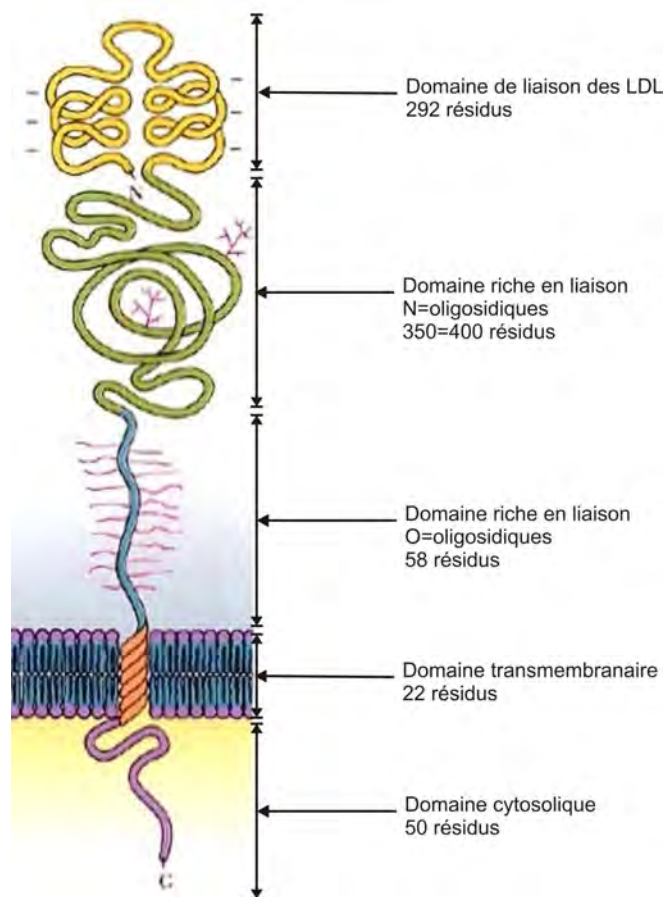


Figure 3: Structure du récepteur aux LDL. Le récepteur aux LDL est constitué de 5 domaines. Le premier domaine est le domaine de reconnaissance du ligand, suivi de deux domaines glycosylés, d'un domaine transmembranaire, et du domaine C terminal cytosolique. (Garret, 2000)

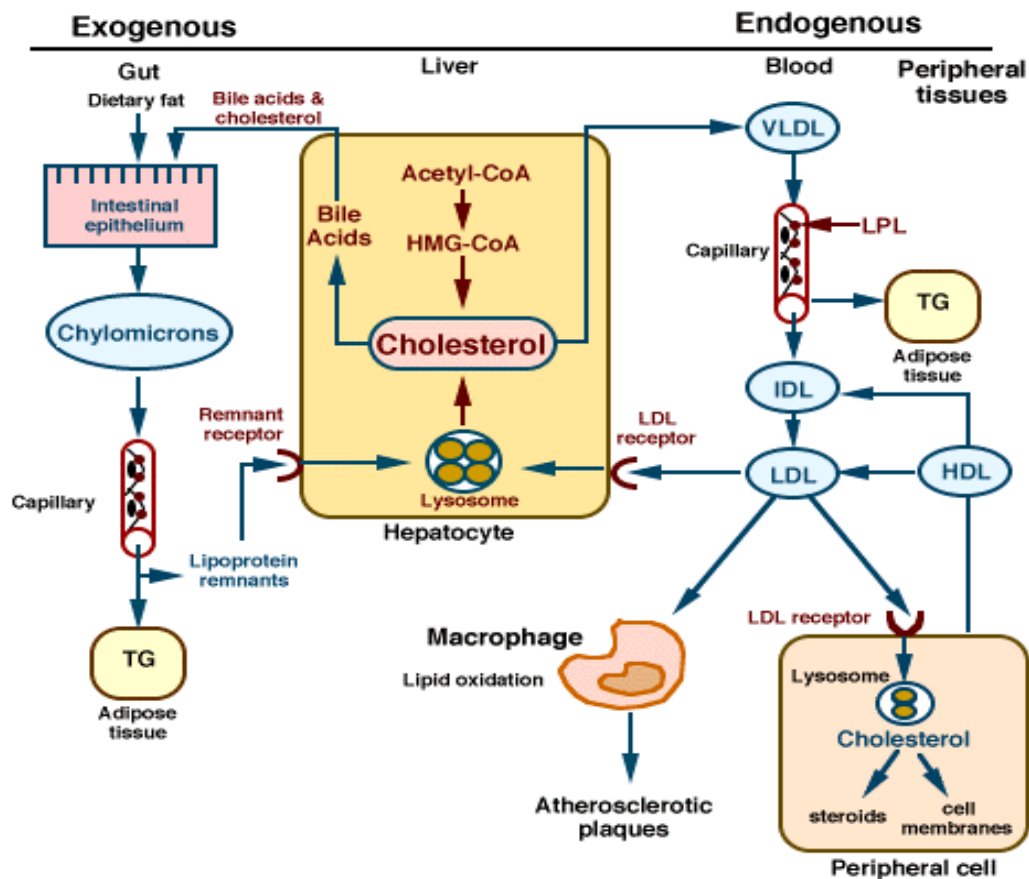


Figure 4: Métabolisme des lipoprotéines. La voie exogène concerne le métabolisme des chylomicrons issus de l'absorption des graisses alimentaires par le plateau strié. Les résidus de chylomicrons sont réabsorbés par le foie. La voie endogène concerne le métabolisme des VLDL, des LDL et des HDL. Les VLDL sont hydrolysées par la lipoprotéine lipase, les résidus de VLDL (IDL) sont transformés en LDL. Les LDL sont captées ensuite via leurs récepteurs au niveau du foie ou des tissus périphériques. Les LDL peuvent aussi subir un processus d'oxydation, les LDL oxydées sont endocytées par les macrophages. Ce processus est à l'origine de la formation des lésions athéromateuses.
(<http://www.ovc.uoguelph.ca/BioMed/Courses/Public/Pharmacology/pharmsite/98409/Blood/hyperlipidemia.html>)

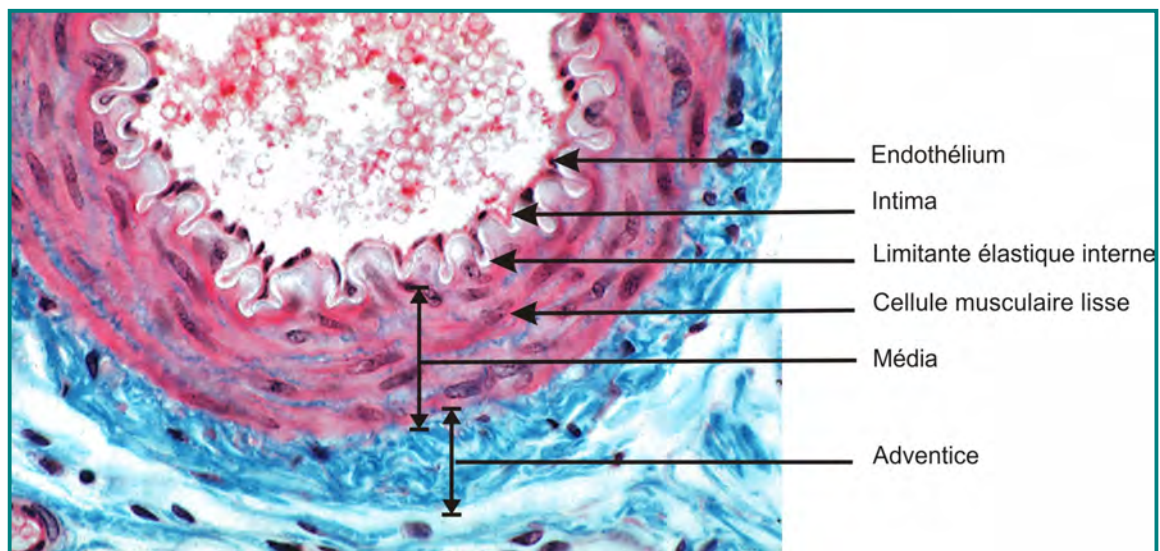


Figure 5: Coupe transversale d'une artère musculaire. Les trois couches formant la paroi artérielle sont l'intima composée de l'endothélium, la média composée de cellules musculaires lisses et l'adventice. Cette coupe est colorée au Trichrome de Masson.
(<http://webcampus.fundp.ac.be/MMEDB254/document/HSH/startHSH.html>)

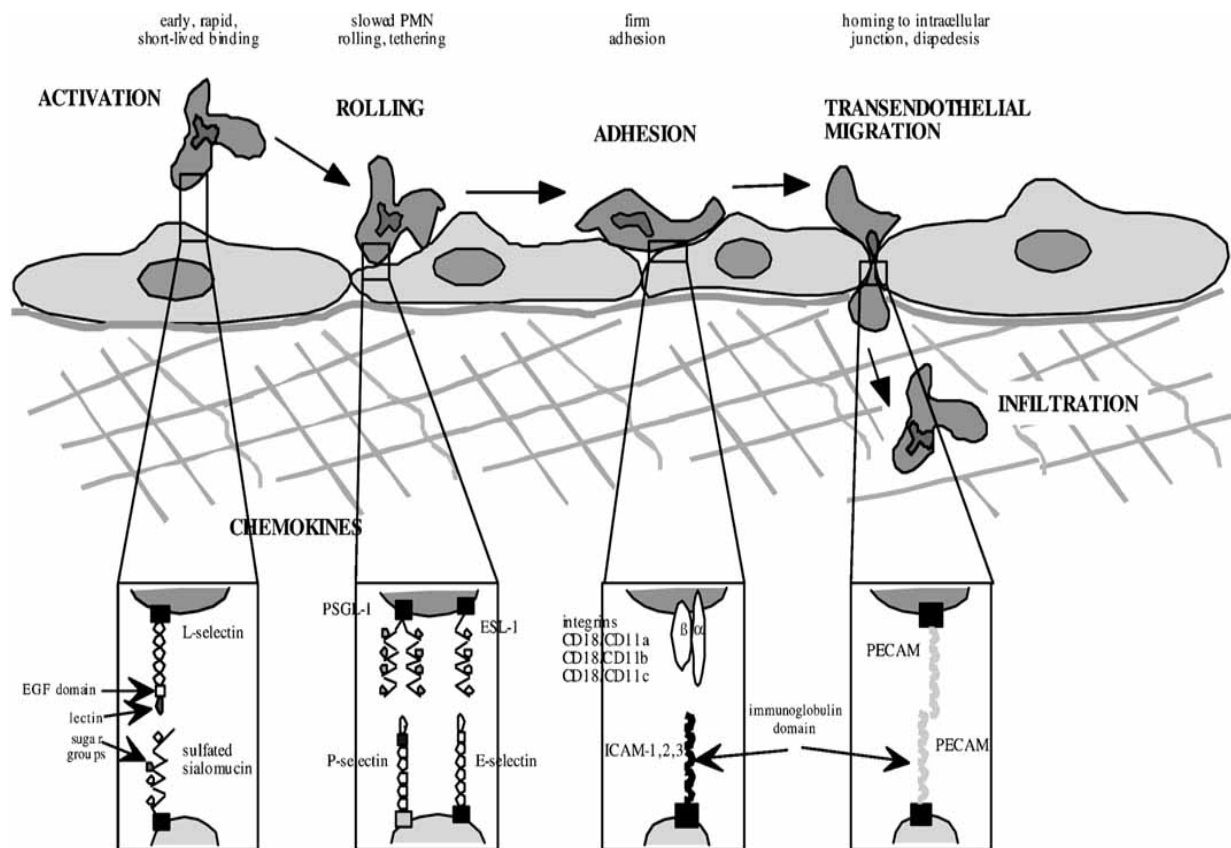


Figure 6: La diapédèse. L'activation de la diapédèse commence par l'expression de la L-sélectine par les leucocytes. L'endothélium exprime les P et E-sélectines reconnaissant PSG-L1 et ESL-1, leur ligand respectif sur les leucocytes, c'est la phase de *rolling*. L'adhésion ferme est modulée par l'expression d'ICAM reconnaissant les intégrines exprimées par les leucocytes. La transmigration des leucocytes à travers l'endothélium nécessite la dissociation des jonctions entre les cellules endothéliales. L'interaction entre les PECAM exprimés par le monocyte et la cellule endothéliale favorise la transmigration (Michiels, 2003).

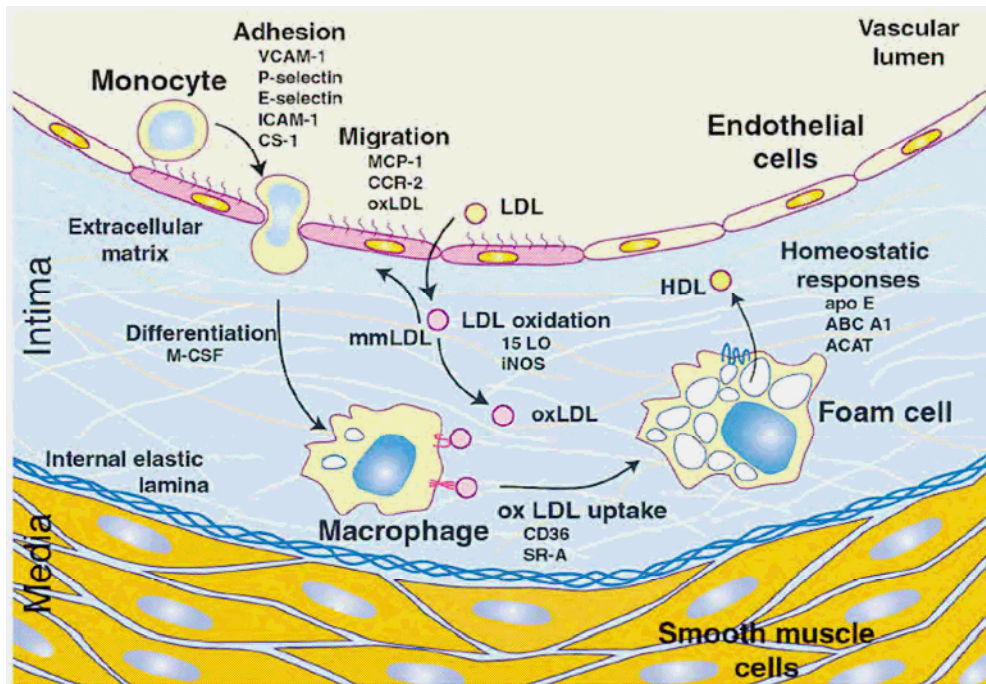


Figure 7: Initiation de la lésion et formation des cellules spumeuses. La diapédèse des monocytes comprend l'expression des molécules d'adhérence ICAM-1, VCAM-1, et des sélectines P et E par l'endothélium. La migration des monocytes est modulée par la sécrétion de facteurs chimiotactiques comme MCP-1 dont le récepteur sur les monocytes est CCR2. Les LDL oxydées jouent aussi le rôle de chémokines dans la transmigration. Les macrophages se différencient en cellules spumeuses (*foam cells*) par endocytose des LDL oxydées médiée par les récepteurs *scavenger* (CD36 et SR-A). Il existe également un mécanisme d'efflux du cholestérol vers le foie par l'intermédiaire des HDL. Ce transport inverse du cholestérol est modulé par les transporteurs *ATP binding cassette A1* (ABCA1), par l'apoprotéine E (apoE) et par l'acylCoA cholestérol acyl transférase (ACAT). (Glass,2001)

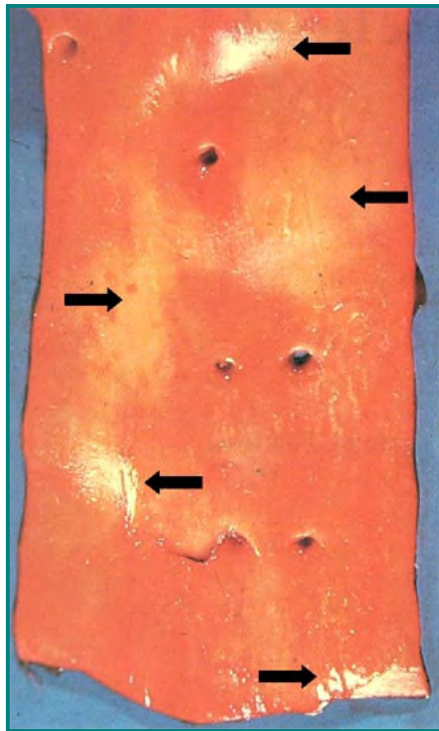


Figure 8: Photographies d'aortes humaines présentant des stries lipidiques. Les flèches indiquent les stries lipidiques qui se manifestent par des plaques jaunâtres.
(<http://library.med.utah.edu/WebPath/CVHTML/CV114.html>)

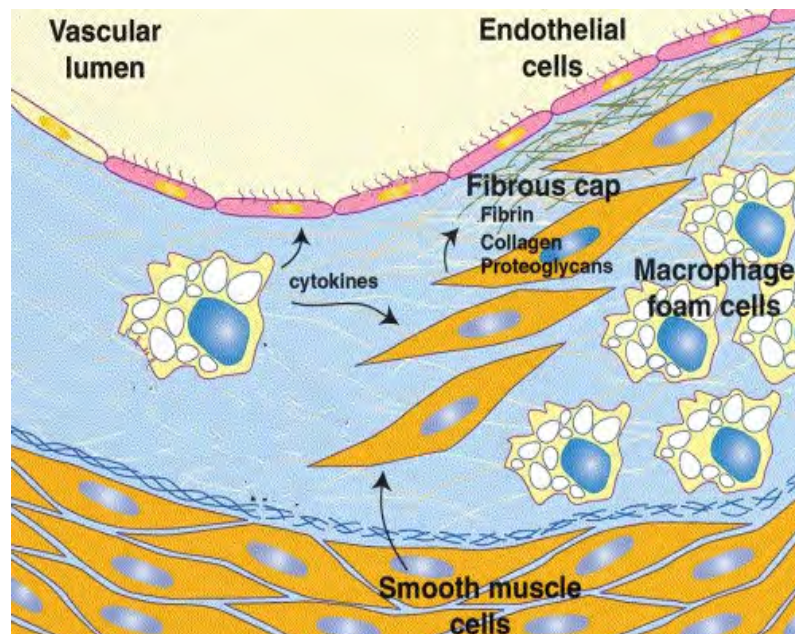


Figure 9: La chape fibreuse. Les cellules musculaires lisses migrent de la média. Elles prolifèrent et forment une capsule autour des cellules sumeuses. Elles synthétisent alors les éléments de la matrice extracellulaire, la fibrine, le collagène et les protéoglycans (Glass, 2001)

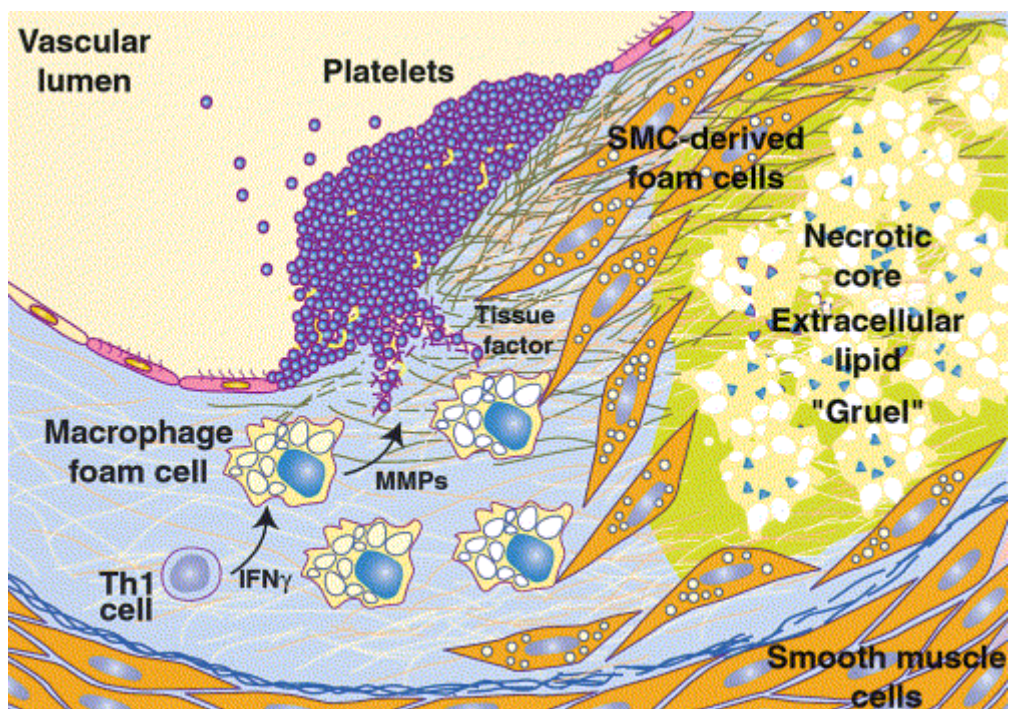


Figure 10: Le cœur nécrotique. Les cellules spumeuses dégèrent et forment le cœur nécrotique constitué de lipides. Les cellules musculaires lisses (SMC) forment une capsule fibreuse autour du cœur nécrotique. Les cellules spumeuses stimulées par l'interféron γ ($\text{IFN } \gamma$) sécrètent des métalloprotéinases (MMPs) qui fragilisent la plaque en détruisant la matrice extracellulaire. L'endothélium s'érode et entraîne l'agrégation des plaquettes. (Glass, 2001)

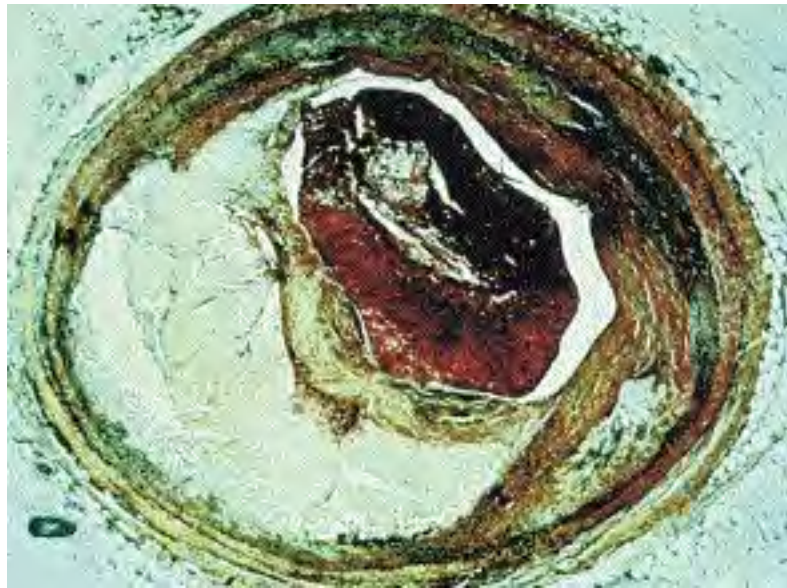


Figure 11: Coupe histologique transversale d'une artère présentant une plaque athéromateuse compliquée d'un thrombus.
(Glass, 2001)

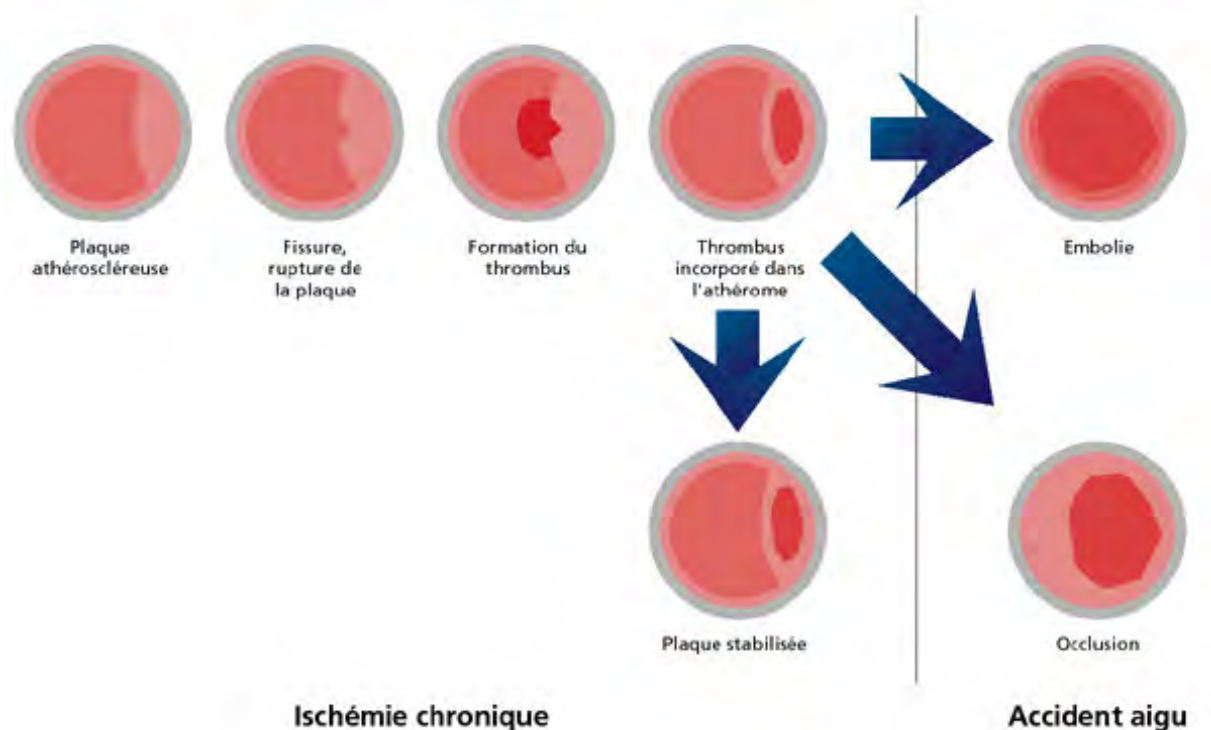


Figure 12: Complications associées à une rupture de la plaque. Lors d'une ischémie chronique, le thrombus formé peut s'intégrer à la plaque athéromateuse, il diminue ainsi la lumière artérielle et par conséquent, l'apport de sang oxygéné. Si le thrombus obstrue totalement la lumière, il mène à des accidents cardiovasculaires aigus. Le thrombus peut également se détacher et créer une embolie dans le territoire situé en aval de la plaque athéromateuse. (<http://www.123bio.net/revues/jleoni/3chap1.html>)

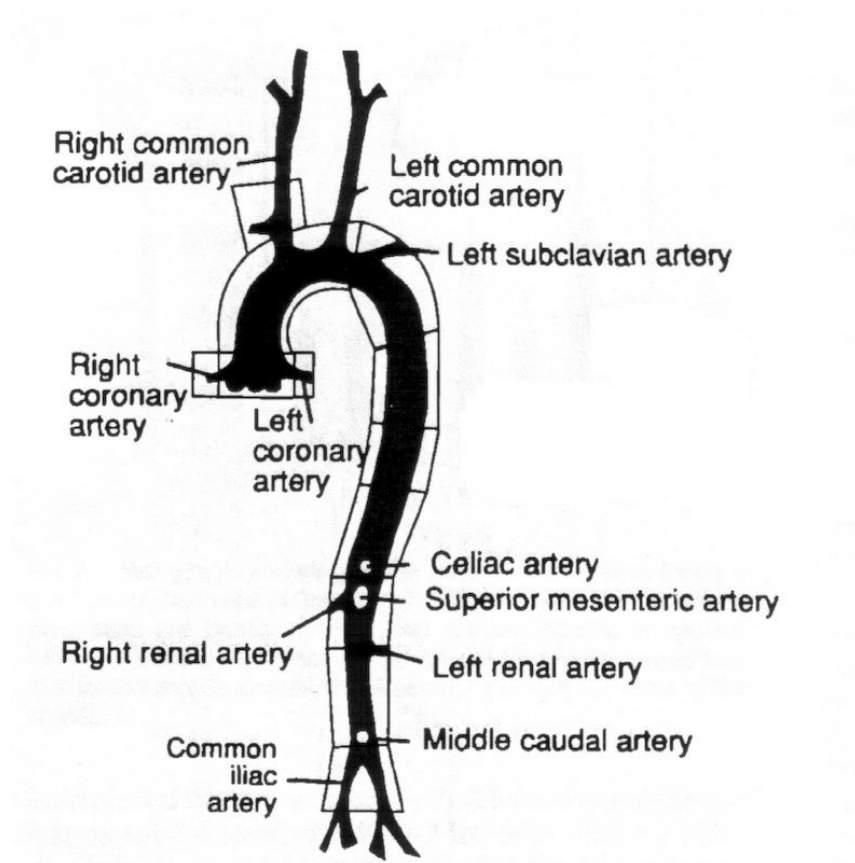


Figure 13: Représentation schématique de l'aorte de souris et de ses principaux embranchements. (Nakashima., 1994)

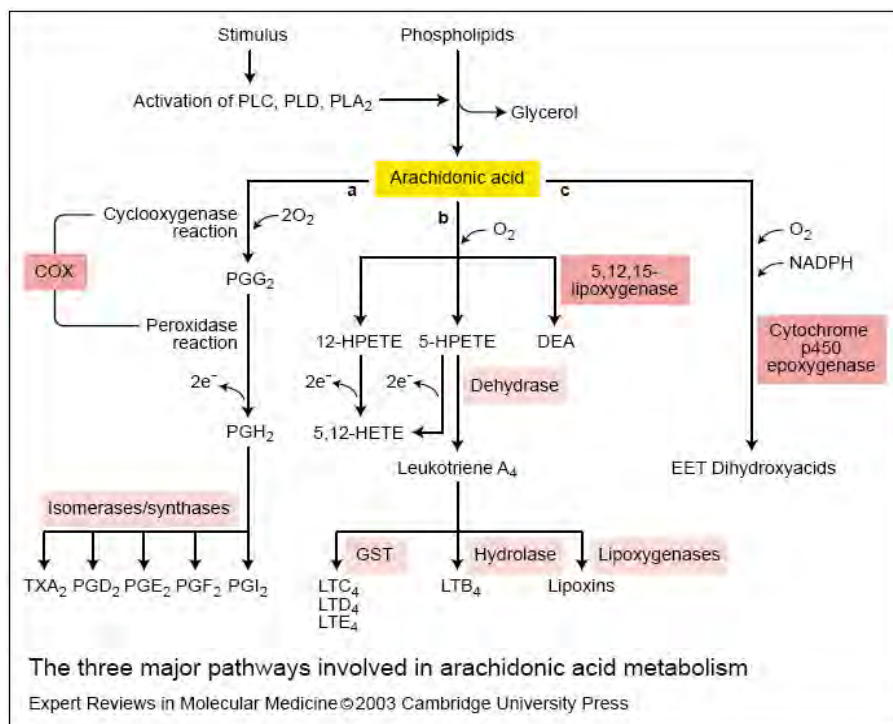


Figure 14: Cascade de l'acide arachidonique. L'acide arachidonique est libéré lors de l'hydrolyse des phospholipides membranaires par les phospholipases. Il devient le substrat des enzymes de 3 voies métaboliques différentes : la voie des cyclooxygénases, la voie des lipoxygénases et la voie des époxygénases. Chacune de ces voies génère respectivement les prostanoïdes, les leucotriènes et les époxydes. PL : phospholipase, PG : prostaglandine, TXA₂ : thromboxane A₂, COX :cyclooxygénase, HPETE : acide hydroperoxyeicosatétraénoïque, HETE : acide hydroxyeicosatétraénoïque, LT : leucotriène.
 (<http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/03005854h.htm>)

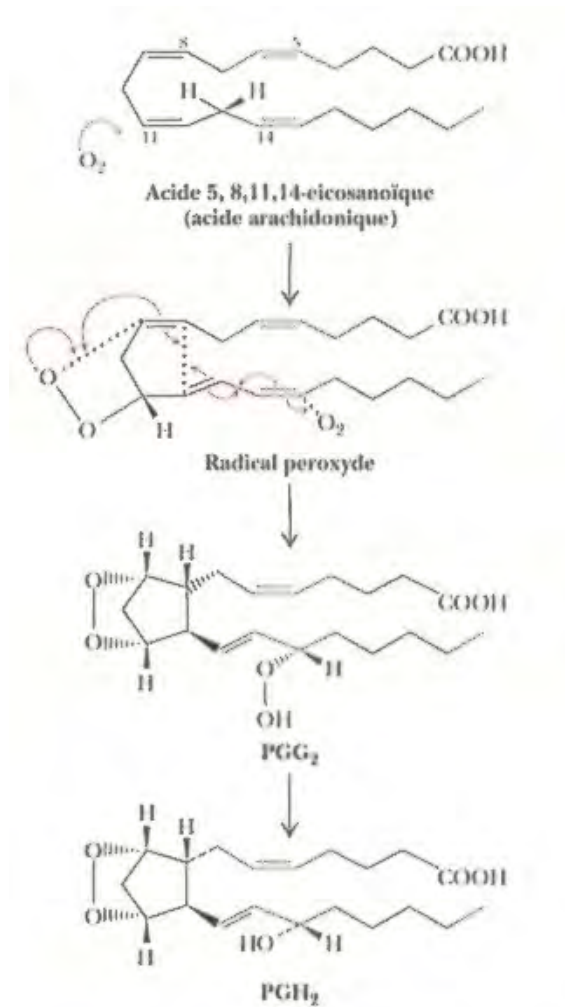


Figure 15: Formation de l'endoperoxyde prostaglandine H₂. Le site catalytique de type cyclooxygénase catalyse la peroxidation de l'acide arachidonique par l'attaque de 2 O₂. Le premier intermédiaire est la prostaglandine G₂ (PGG₂), un endoperoxyde instable. Le site catalytique de type peroxydase réduit la PGG₂ en prostaglandine H₂ (PGH₂) (Garret, 2000)

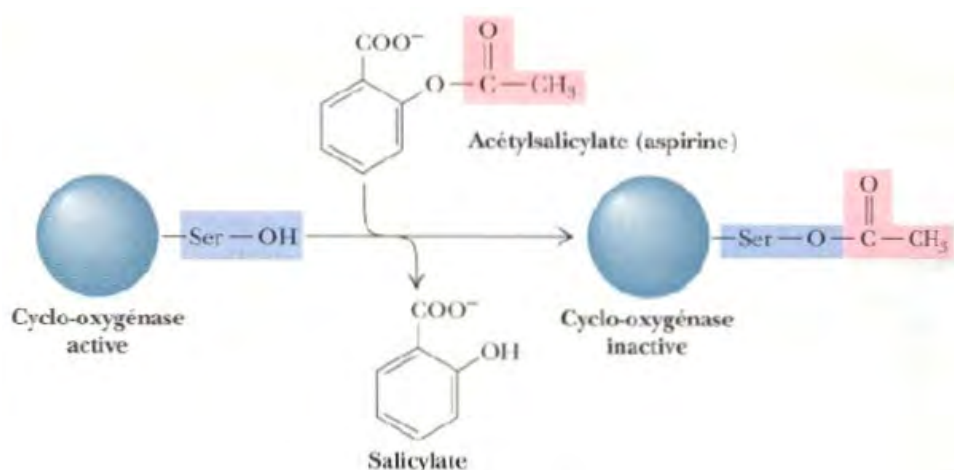


Figure 16: Inhibition de la cyclooxygénase par l'aspirine. Le groupement acétyle de l'aspirine (acétylsalicylate) est greffé sur une sérine du site actif de l'enzyme, rendant la cyclooxygénase inactive. (Garret, 2000)

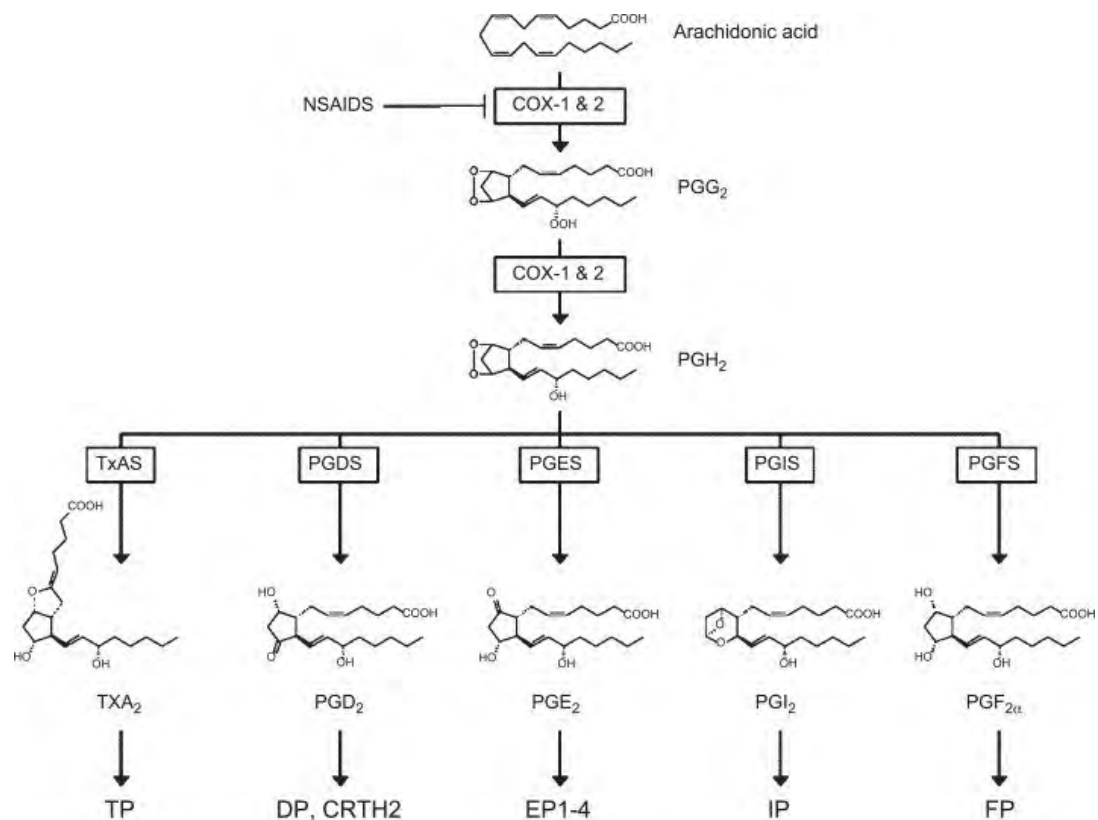
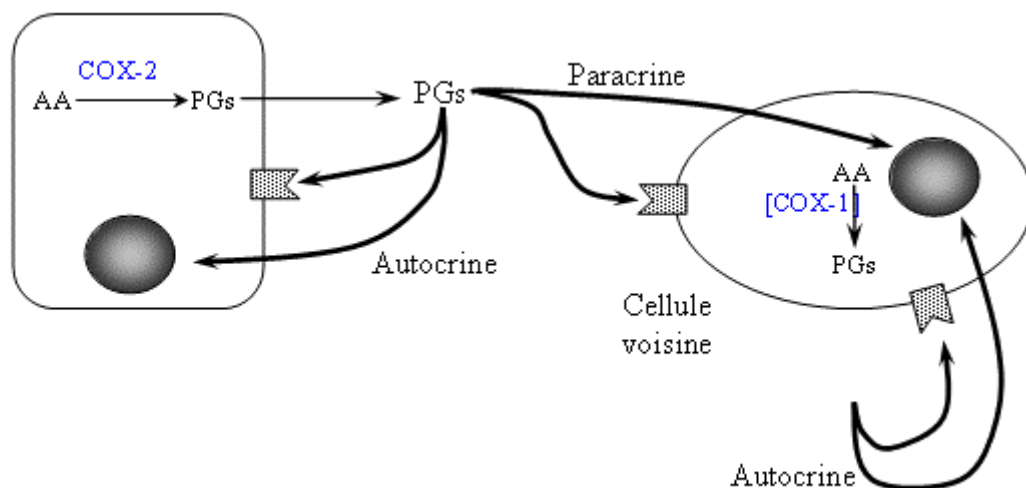


Figure 17: Cascade de l'acide arachidonique : formation des prostanoïdes. COX : cyclooxygénase, NSAIDS : NonSteroidal Anti-Inflammatory Drugs, PG : prostaglandine, TXA₂ : thromboxane A₂ (Hata et al, 2004)



(Katori M. et Majima M., 2000).

Figure 18: Action autocrine et paracrine des prostaglandines. AA : acide arachidonique, COX : cyclooxygénase, PG : prostaglandine (Katori et al, 2000).

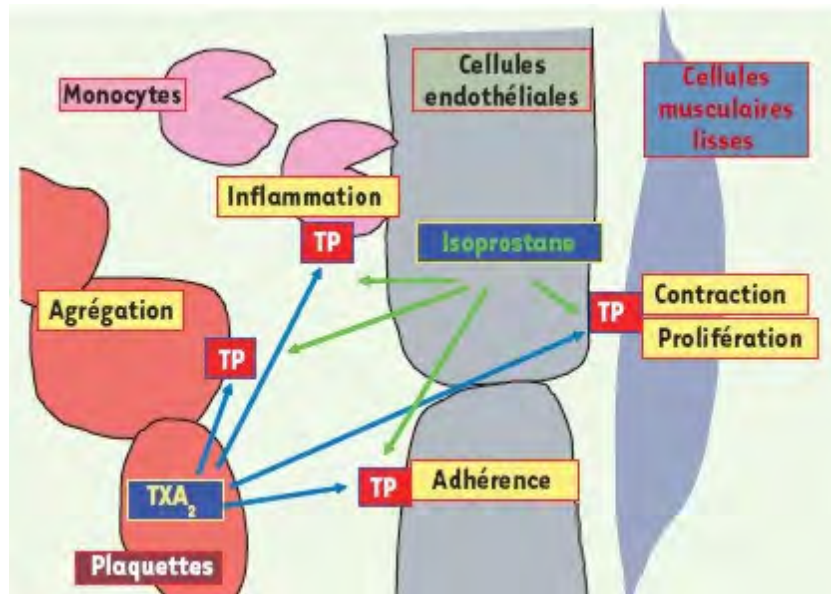


Figure 19: Effet de l'interaction du thromboxane A₂ et des isoprostanes avec le récepteur du TXA₂ (TP) sur différents types cellulaires. (Verbeuren, 2006)

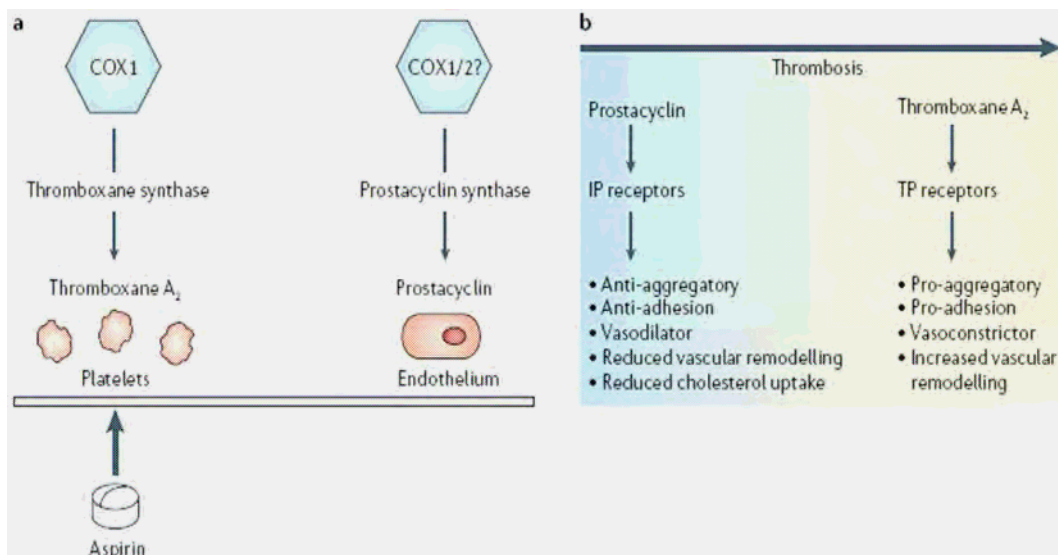


Figure 20: Propriétés du thromboxane A₂ et de la prostacycline. a : La formation du TXA₂ est attribuable à la COX-1 et son action porte majoritairement sur les plaquettes. Le précurseur de la formation de la PGI₂ serait plutôt fourni par COX-1 et la COX-2. b : Propriétés du thromboxane A₂ et de la prostacycline. (Mitchell et al, 2005)

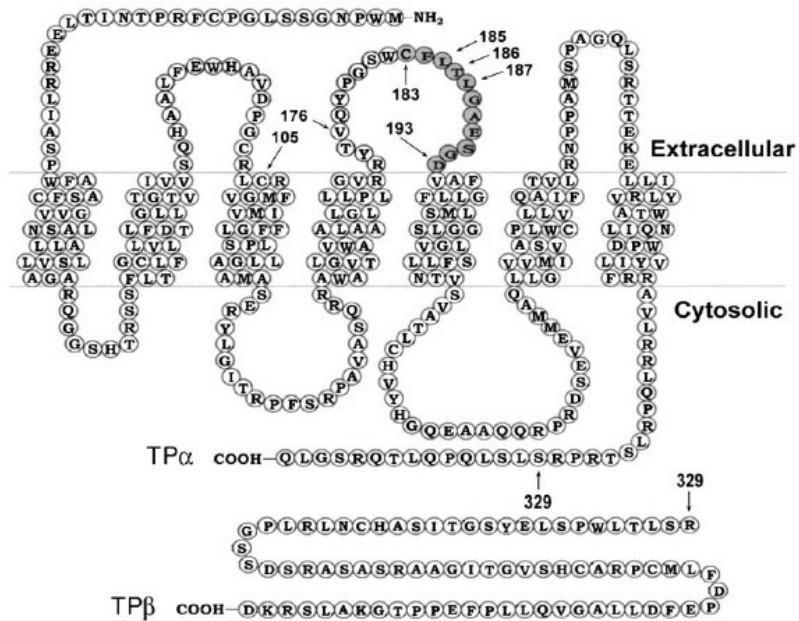


Figure 21: Structure des isoformes TPα et TPβ, récepteurs du TXA₂.
(Huang et al, 2004)

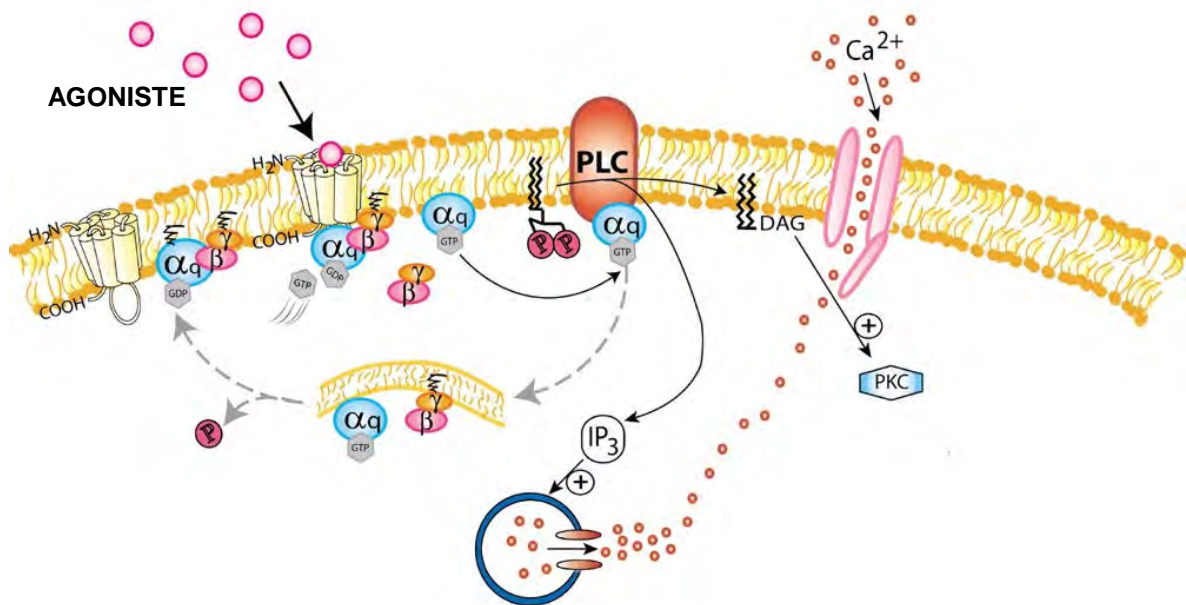
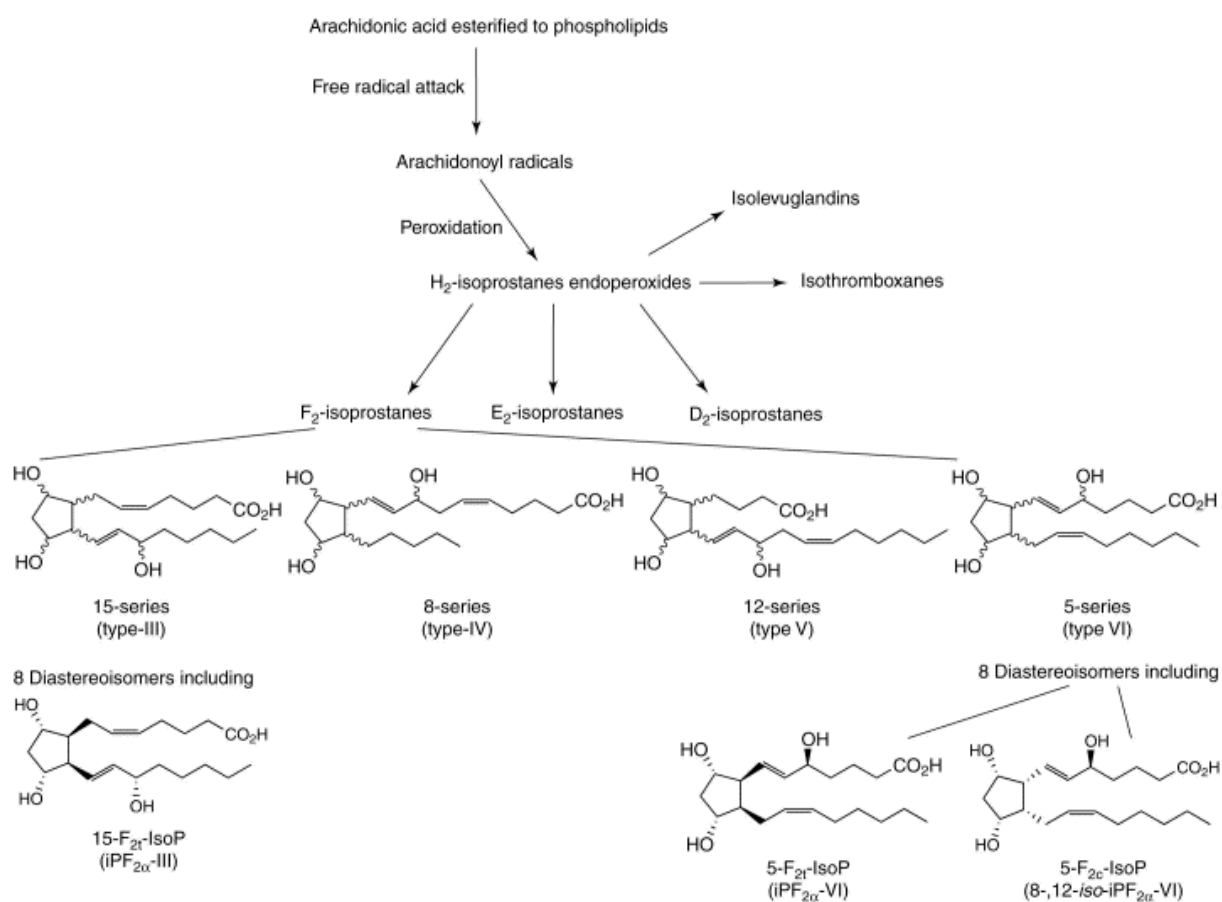


Figure 22: Transduction du signal du récepteur du thromboxane A₂. Dès sa liaison à l'agoniste, le récepteur change de conformation, ce qui constitue un signal pour l'acquisition d'un GTP par la sous-unité α (αq) qui se dissocie alors du complexe formé par les sous unités β et γ. La sous-unité α active l'effecteur phospholipase C libérant les messagers secondaires : inositol-3-phosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG). L'IP₃ en se fixant sur son récepteur permet la mobilisation du calcium intracellulaire. Le DAG resté ancré à la membrane, et le calcium sont à l'origine de l'activation et de la translocation en membrane de la protéine kinase C. (Figure modifiée de Billington, 2003)



TRENDS in Pharmacological Sciences

Figure 23: Génération des isoprostanes. L'acide arachidonique est transformé en radical arachidonyle par l'attaque des ROS. La peroxydation de ce radical produit un endoperoxyde instable, l'isoprostane H_2 . L'isoprostane H_2 est réduit et peut donner les isoprostanes F_2 , E_2 , D_2 . Chaque famille d'isoprostanes donne 4 régioisomères (série 15, 8, 12 et 5). Chaque série comporte au total 8 diastéréoisomères. (Cracowski, 2002)

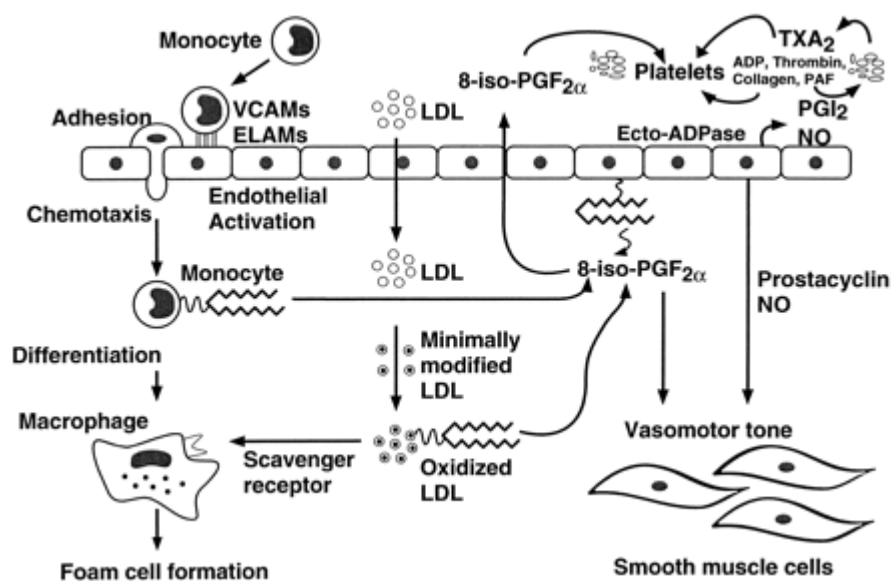
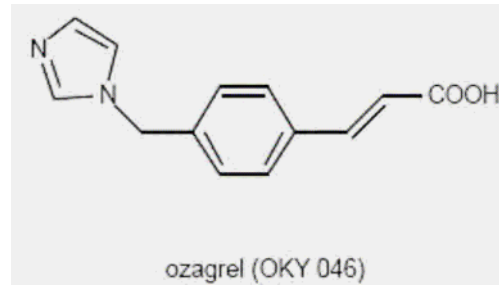
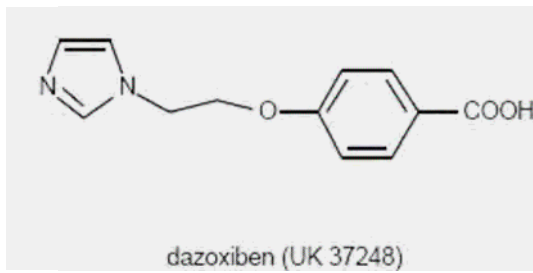


Figure 24: Site de formation du 8-iso-PGF_{2α} et cellules cibles dans la pathologie athéromateuse. Le 8-iso-PGF_{2α} est formé à partir des phospholipides membranaires et des LDL. Le 8-iso-PGF_{2α} exerce son action sur les cellules musculaires lisses et les plaquettes. (Patrono et al, 1997)

A



B

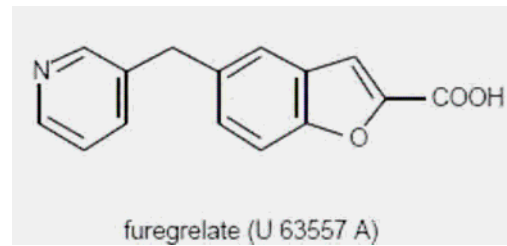
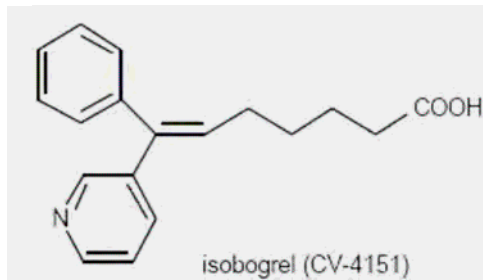


Figure 25: Structures d'inhibiteurs de la thromboxane synthétase. A : Les inhibiteurs dérivés de l'imidazole : le dazoxiben et l'ozagrel. B : les inhibiteurs dérivés de la pyridine : l'isobogrel et le furegrelate. (Dogné, 2000)

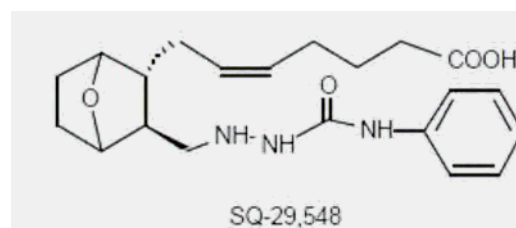
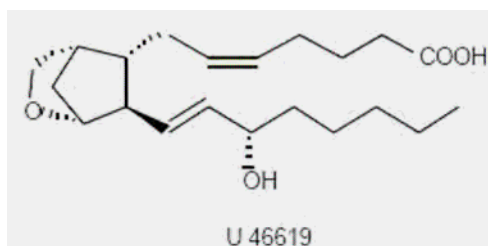


Figure 26: Structures du U-46619 et du SQ-29,548, agoniste et antagoniste de référence du récepteur TP, respectivement. (Dogné, 2000)

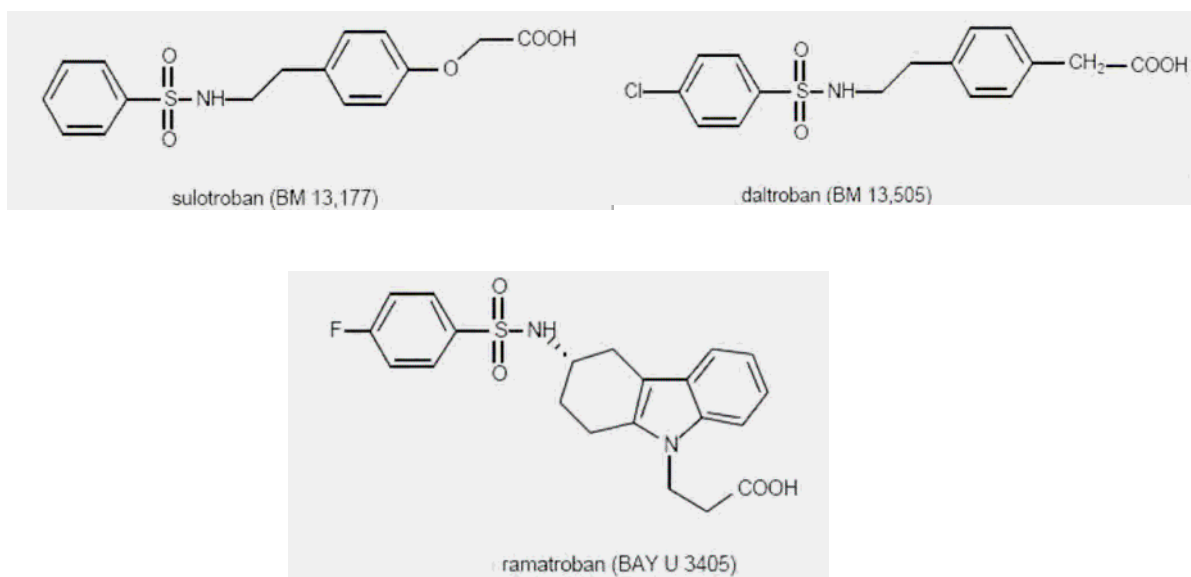


Figure 27: Structures d'antagonistes du récepteur TP, le sulotroban, le daltroban et le ramatroban. (Dogné, 2000)

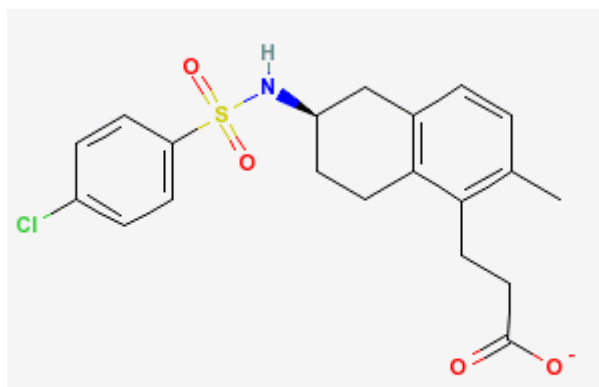


Figure 28 : Structure du térutroban (S-18886).
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites>)

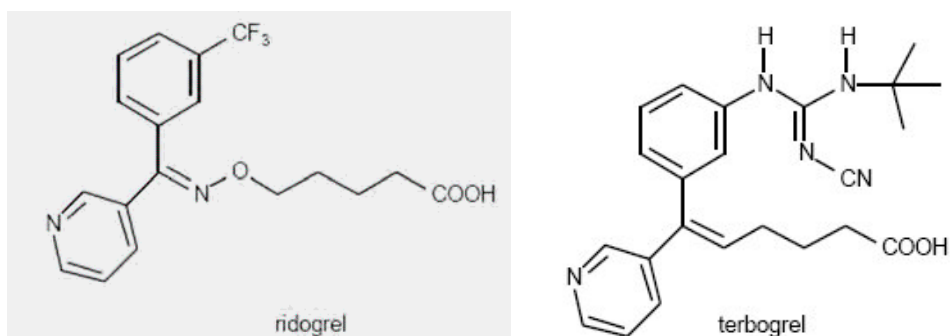


Figure 29: Structures d'agents mixtes, le ridogrel et le terbogrel, inhibiteurs de la tromboxane synthétase et antagonistes du récepteur TP. (Dogné, 2000)

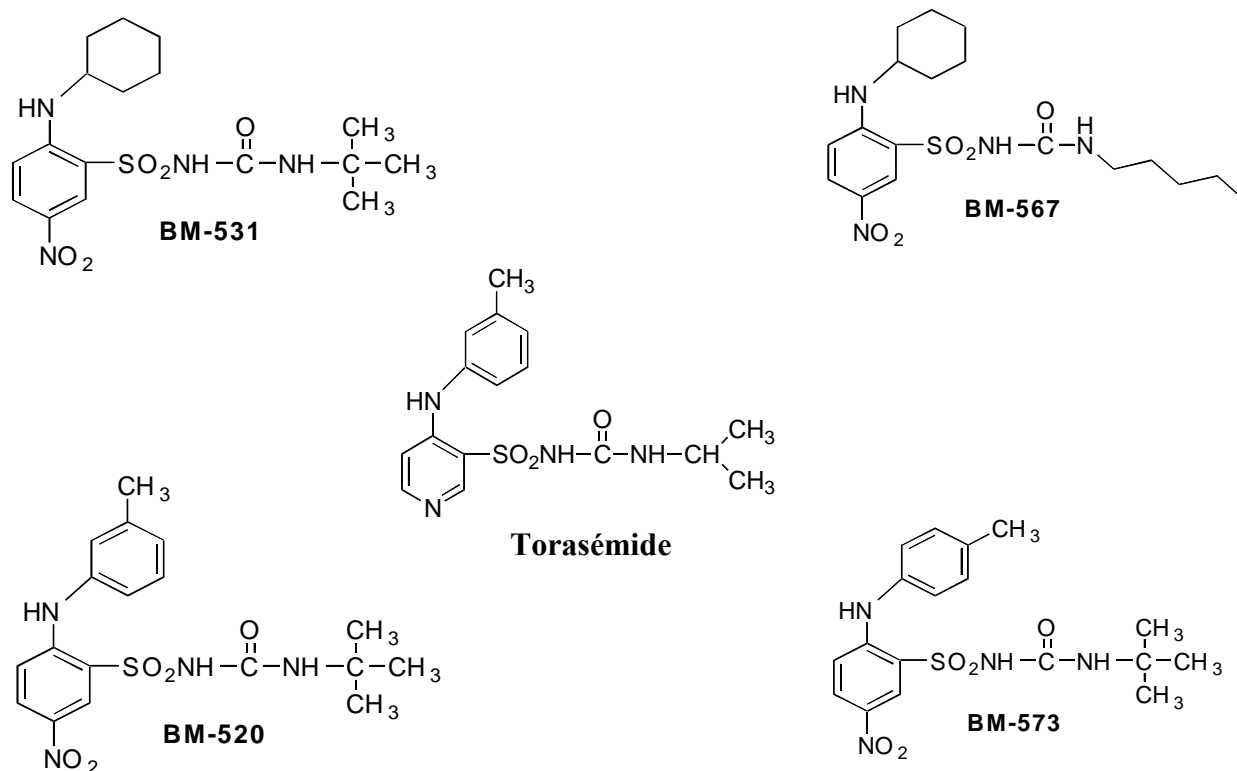


Figure 30 : Structures du BM-531, du BM-567, du BM-520 et du BM-573 et du torasémide. (Rolin et al., 2001 ; Rolin et al. 2003 ; Dogné et al., 2003 ; Dogné et al., 2001)

II. MATERIEL ET METHODES

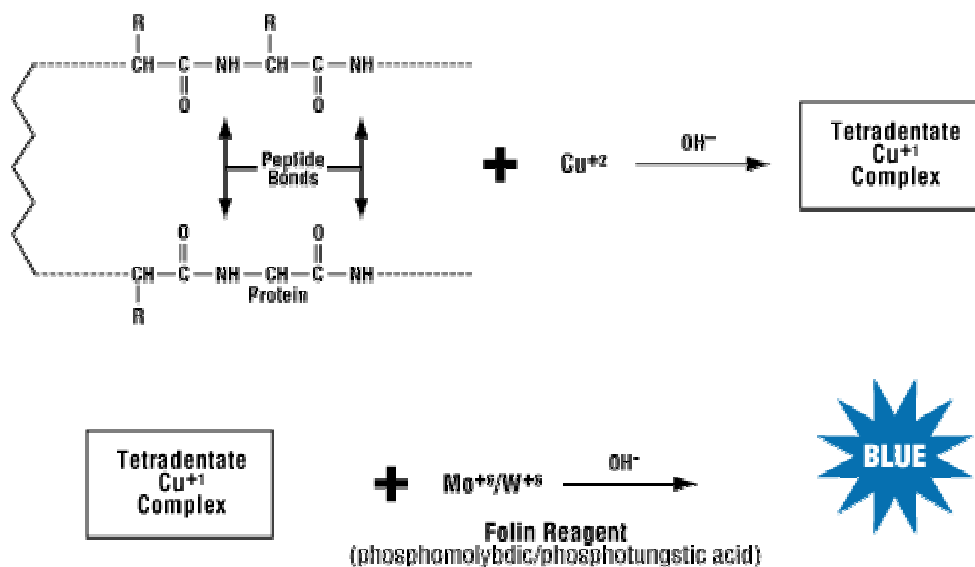


Figure 1: Dosage des protéines par le réactif de Folin. La première étape du dosage est une réaction entre les ions Cu^{2+} et les liaisons peptidiques des protéines en milieu alcalin. Le complexe formé comporte des ions monovalents de cuivre qui réagiront avec le réactif de Folin pour former un composé bleu dont l'absorbance est lue à 740 nm.
(<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/lowry.html>)

50 mL de Na_2CO_3 5%
 Dissoudre 5 g de Na_2CO_3 dans 100 mL d'eau
 500 μL de **Tartrate** 2%
 Dissoudre 0,02 g de Tartrate dans 1 mL d'eau
 500 μL de **CuSO_4** 1%
 Dissoudre 0,01 g de CuSO_4 dans 1 mL d'eau

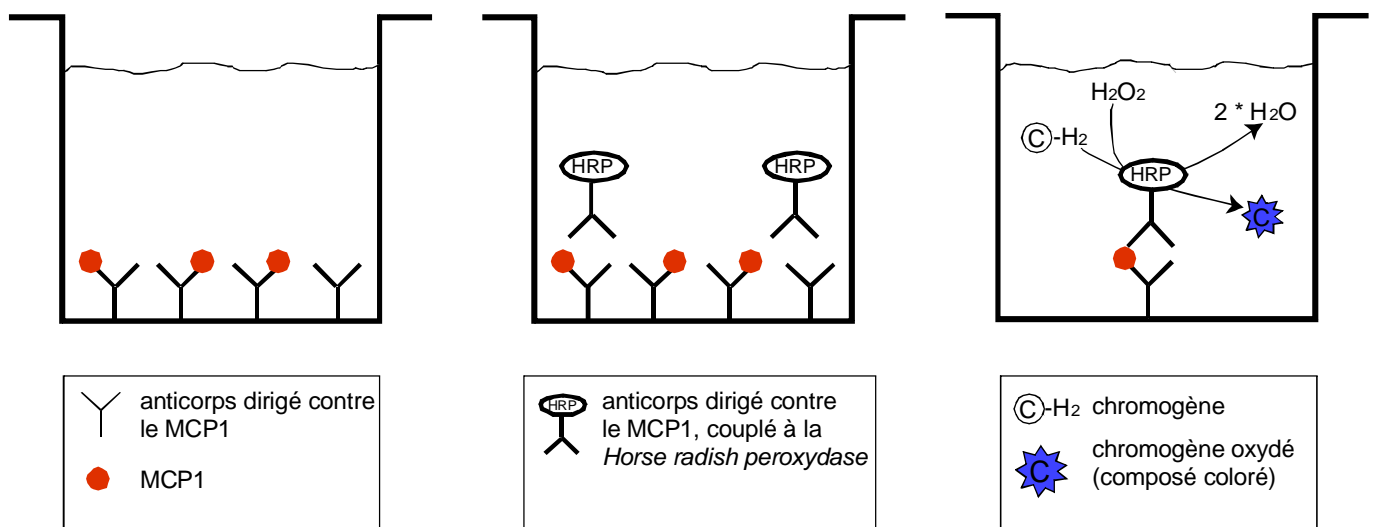


Figure 2: Principe du dosage de MCP-1. L'anticorps attaché au fond du puits permet d'isoler de la MCP-1. La quantité de MCP-1 dans l'échantillon est déterminée à l'aide d'un anticorps secondaire dirigé contre la MCP-1 et couplé à la HRP. La dégradation du peroxyde d'hydrogène par la peroxydase entraîne l'oxydation d'un composé chromogène qui devient coloré à l'état oxydé. L'abondance du composé coloré dans le puits est donc proportionnelle à la quantité de MCP-1.

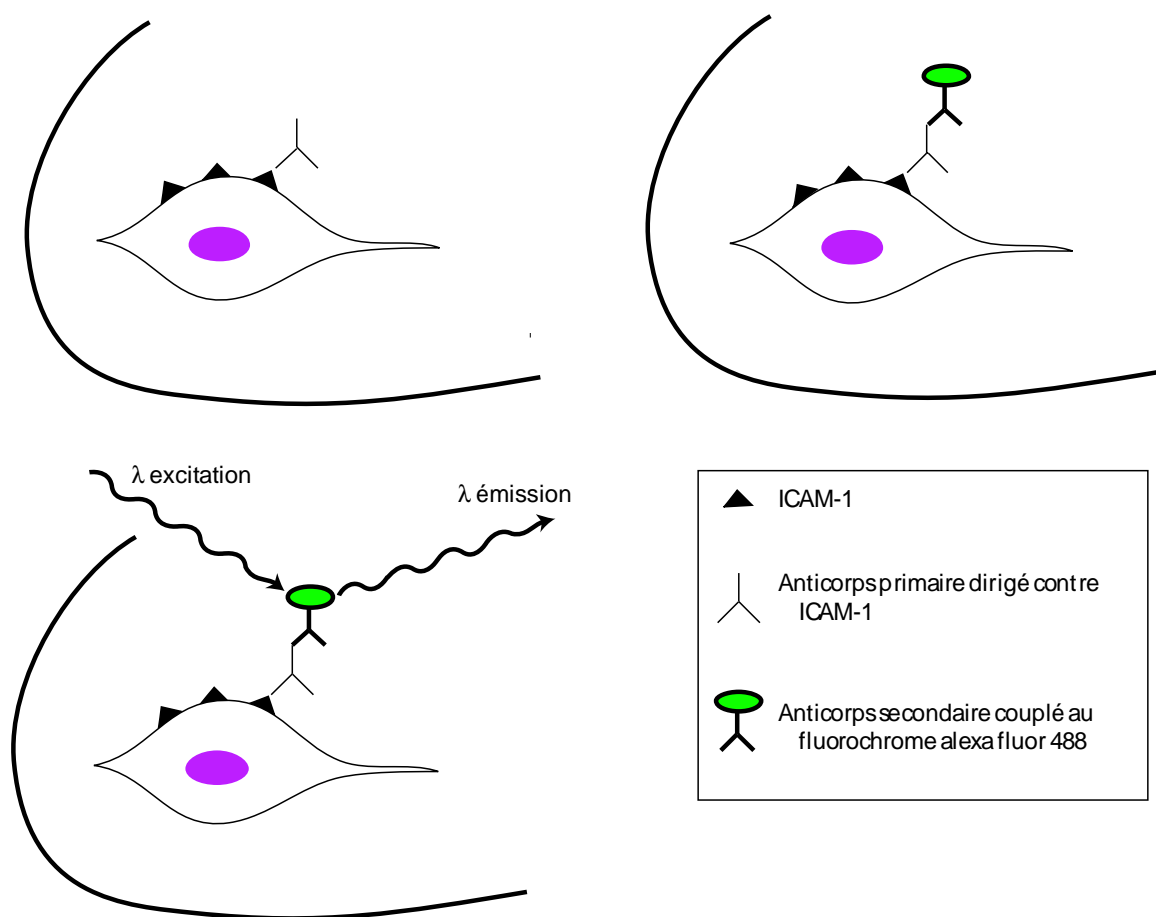


Figure 3: Principe de l'immunofluorescence. Dans un premier temps, l'anticorps primaire reconnaît ICAM-1 en surface de la cellule. Dans un second temps, l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa fluor 488 est dirigé contre le fragment FC de l'anticorps primaire. Le fluorochrome est ensuite excité par un faisceau laser ; il transmet alors cette énergie sous forme de fluorescence verte pour retourner à son état de repos.

Phosphate Buffer Saline (PBS) 1 L
9 g NaCl
20 mL tampon phosphate 0,5 M, pH 7,4
PBS + BSA 2% 100 mL
Dissoudre 2 g BSA dans 100mL de PBS
PBS + PFA 4% 100 mL
Dissoudre 4 g de paraformaldéhyde dans 100mL de PBS et chauffer à 80°C
PBS + Triton X100 1%
Dissoudre 1 g de TritonX100 dans 100 mL de PBS

Tableau 2: Immunofluorescence : Composition des solutions de rinçage, de fixation et de perméabilisation.

Quantité	Réactifs	Description
1 mL	Tampon de lyse 2X, pH 7,5	Tris 40 mM
		KCL 300 mM
		EDTA 2mM
20 µL	Triton X100 1%	Détergent neutre
580 µL	Eau	
200 µL	PIC (cocktail d'inhibiteur de phosphatase)	Na ₃ VO ₄ 25 nM
		PNPP 250 nM
		β glycérophosphate 250 nM
		NaF 125 nM
200 µL	PIB (cocktail d'inhibiteur de protéase)	1 tablette (<i>Complete protease inhibitor cocktail tablet 25X</i>) diluée dans 1 mL d'eau

Tableau 3 : Composition du tampon de lyse cellulaire.

$$\frac{(\text{DO}_{\text{moyenne test}} - \text{DO}_{\text{moyenne tampon lyse}}) / (\text{DO}_{\text{moyenne étalon}} - \text{DO}_{\text{moyenne blanc eau}})}{\text{volume des échantillons } \mu\text{L}} \times 3,7 \mu\text{g} = \mu\text{g de protéine}/\mu\text{L}$$

Figure 4 : Formule pour le calcul de la concentration en protéine lors du dosage de Bradford.

Tampon de migration		
Solution 1 (1x) déposée autour des gels	Stock NuPage MOPS SDS Running Buffer (20x)	50 mL
	H ₂ O	9950 mL
Solution 2 déposée entre les 2 gels	Solution 1	200 mL
	Stock antioxydants NuPage	500 μL

Tampon d'échantillon bleu	
Stock NuPage LDS Sample Buffer	100 μL
DTT 0,5N	10 μL

Tampon de transfert	
Stock NuPage transfert buffer	10 mL
Méthanol 10% (pour 1 gel)	20 mL
Stock antioxydant NuPage	200 μL
Eau	150 mL

Solution pour la révélation		
Solution TBS 10x pH 7,4	Tris	24,22 g
	NaCl	80,06 g
	Eau	1 L
Solution TBS-T 1x	TBS 10x	100 mL
	Tween 20	1 mL
	Eau	899 mL
Solution de blocking	TBS-T 1x	100 mL
	Lait « Amersham »	2 g

Tableau 5 : Composition des tampons nécessaires pour le Western Blot : le tampon de migration, le tampon d'échantillon, le tampon de transfert et la solution de rinçage et de *blocking* pour la révélation.

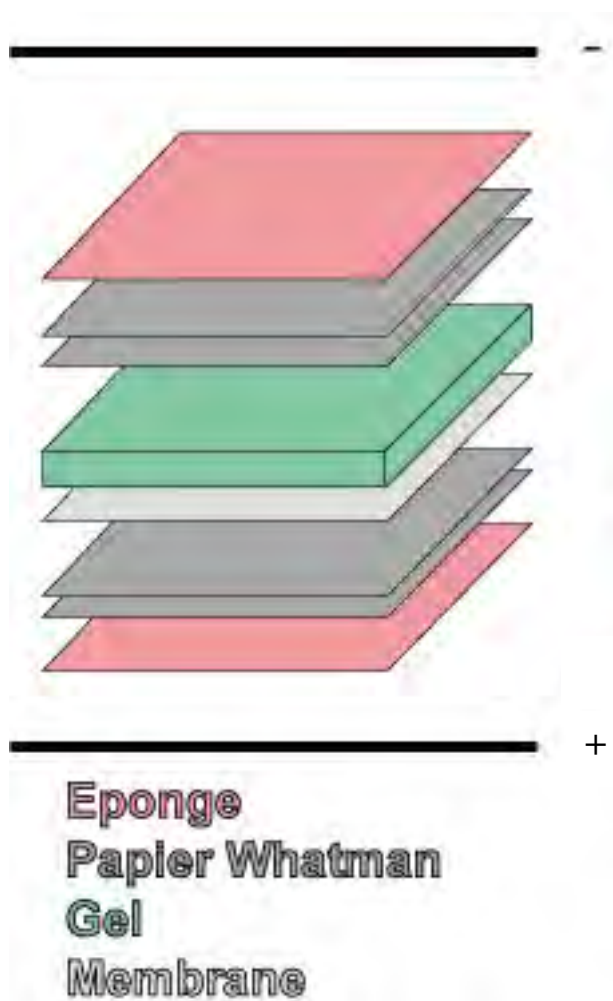


Figure 5: Montage pour le transfert des protéines sur la membrane. La membrane est située du côté de l'anode, le gel est situé au dessus de celle-ci. Deux papiers Whatman et une éponge imbibés de tampon de transfert sont disposés de part et d'autre du gel et de la membrane.

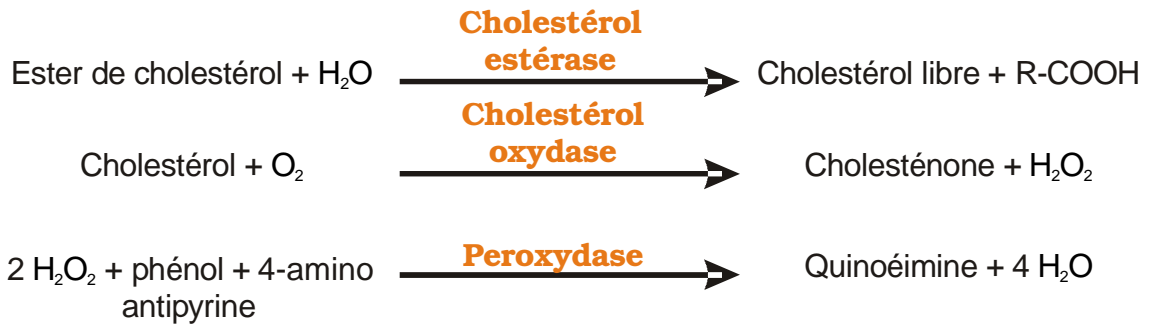
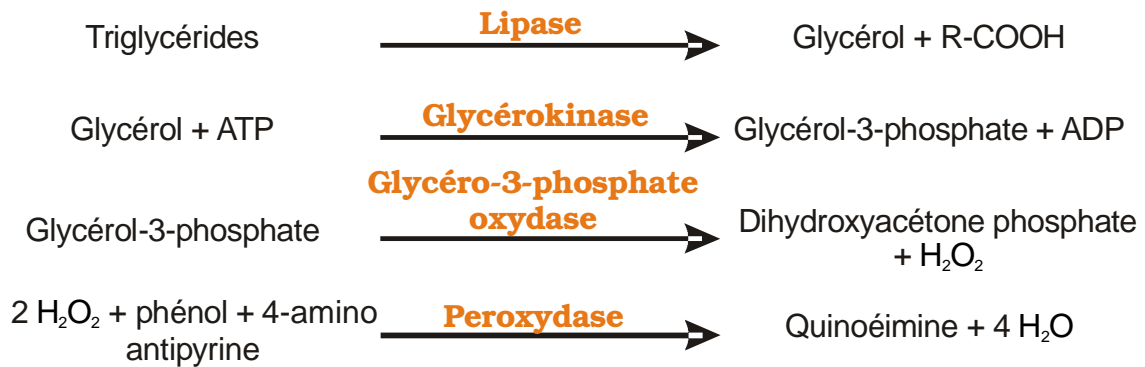
A**B**

Figure 6 : Réactions enzymatiques impliquées dans le dosage du cholestérol total (A) et des triglycérides (B) en colorimétrie.

$$\text{LDL} = \text{CT} - \text{HDL} - (\text{TG}/5)$$

Figure 7 : Formule de Friedewald pour le calcul de la concentration en LDL. (CT : cholestérol total, TG : triglycérides)

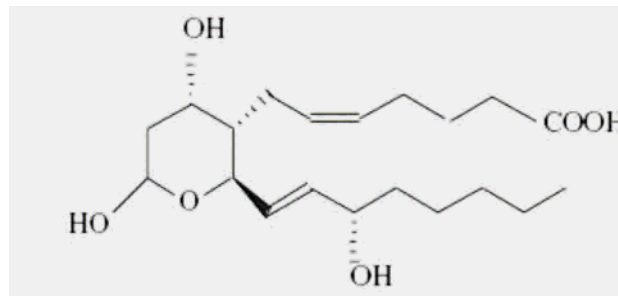


Figure 9 : Formule chimique du thromboxane B₂.

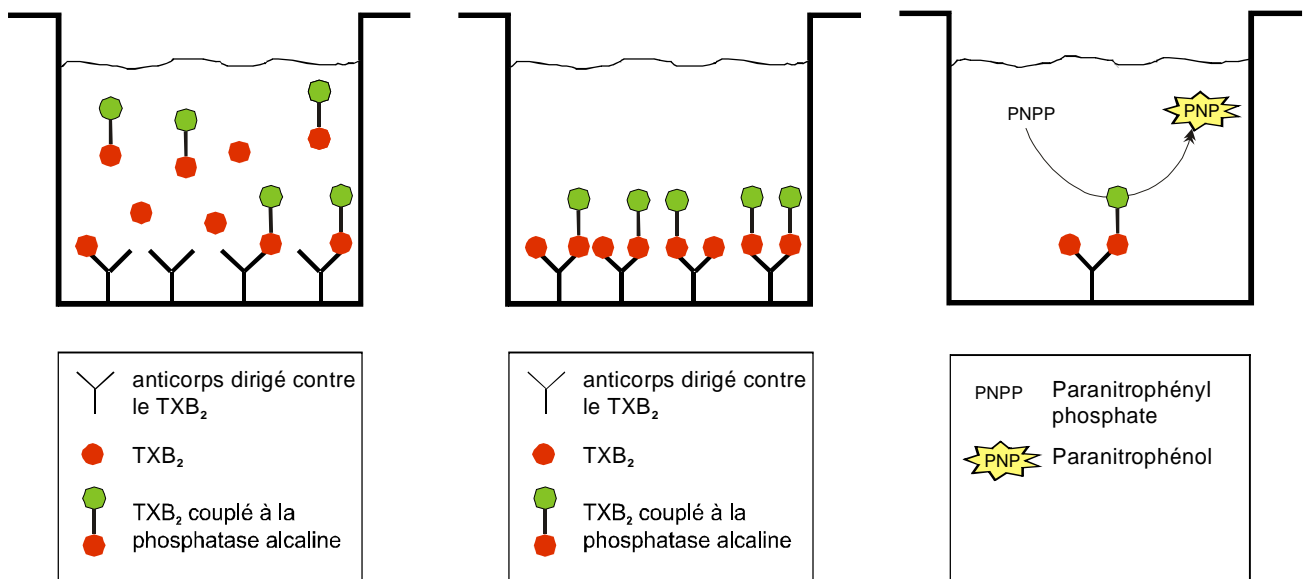


Figure 10 : Principe du dosage de TXB₂. Le TXB₂ de l'échantillon et le TXB₂ couplé à la phosphatase alcaline entrent en compétition pour les sites de liaison de l'anticorps recouvrant le fond du puits. Après les rinçages, le substrat de la phosphatase alcaline, le paranitrophénylphosphate est métabolisé en paranitrophénol qui est un composé jaune. La concentration de ce composé est inversement proportionnelle à la concentration de TXB₂ dans l'échantillon.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

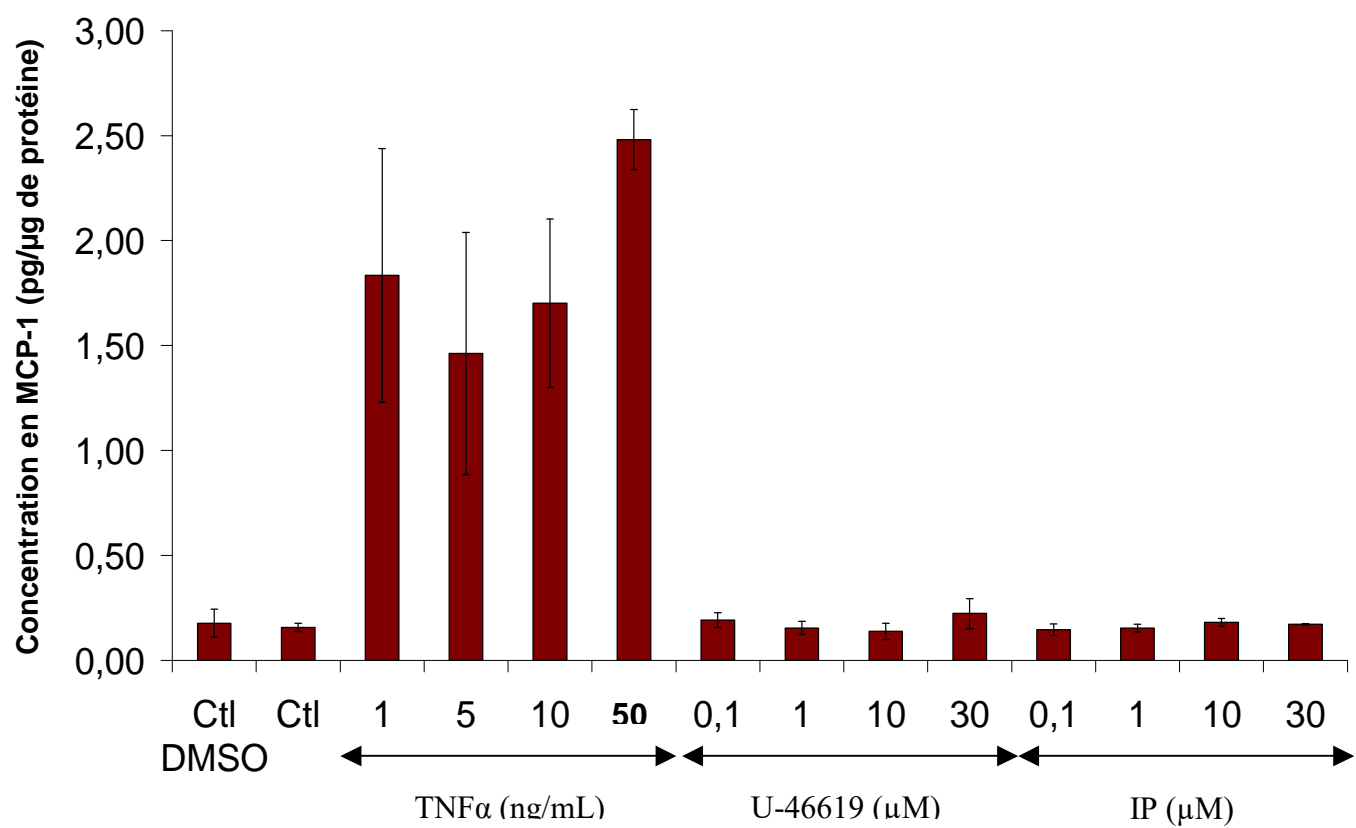


Figure 1: Dosage de MCP-1 (pg/μg de protéine) dans le milieu de culture des cellules EAhy926 après une stimulation de 4h au TNFα (1, 5, 10 et 50 ng/mL), au U46619 (0,1, 1, 10 et 30 μM) et au 8-*iso*-PGF_{2α} (0,1, 1, 10 et 30 μM) (Moyennes \pm S.D.).

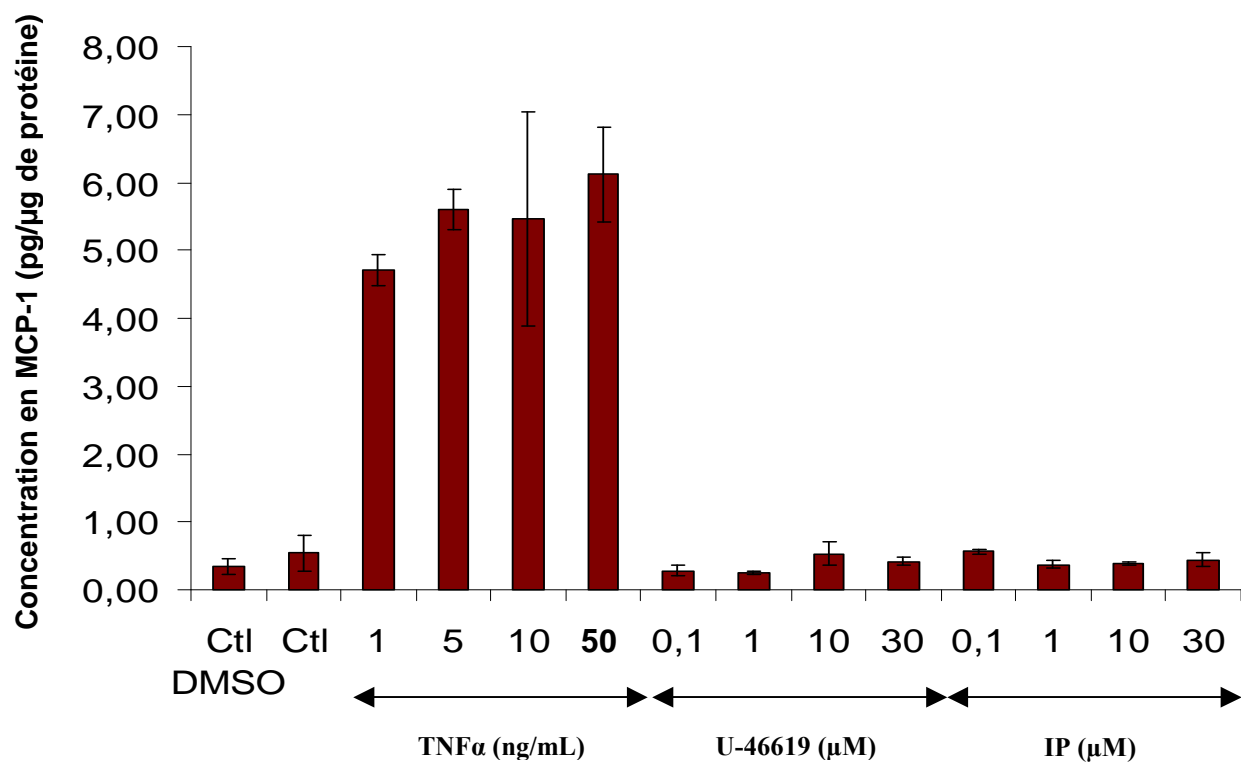


Figure 2 : Dosage de MCP-1 (pg/μg de protéine) dans le milieu de culture des cellules EAhy926 après une stimulation de 6h au TNFα (1, 5, 10 et 50 ng/mL), au U46619 (0,1, 1, 10 et 30 μM) et au 8-iso-PGF_{2α} (0,1, 1, 10 et 30 μM) (Moyennes ± S.D.).

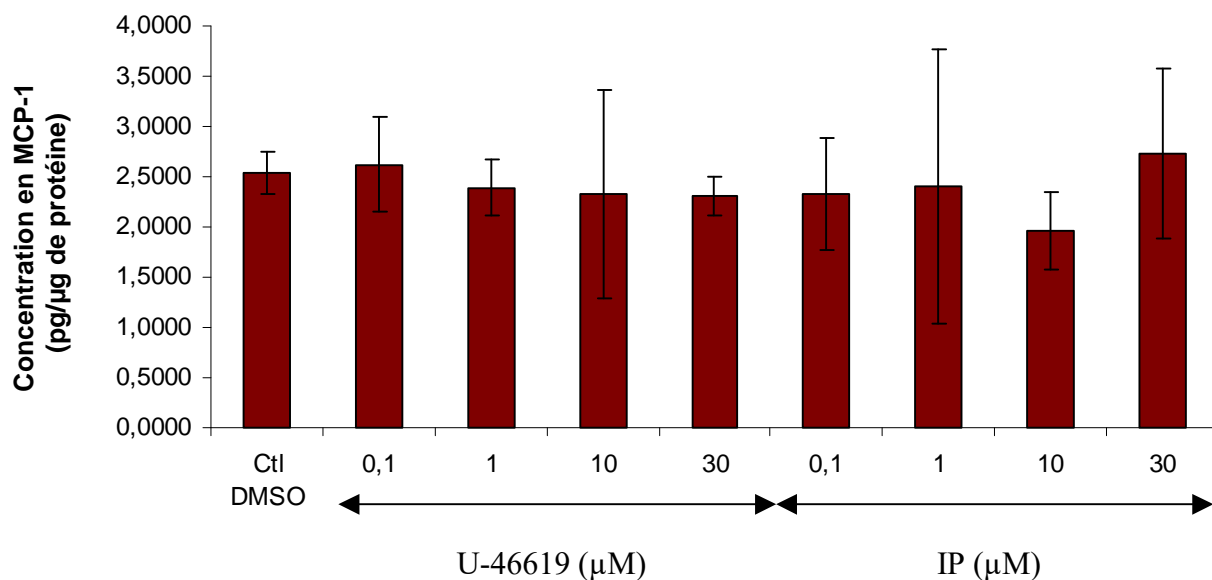


Figure 3 : Dosage de MCP-1 (pg/μg de protéine) dans le milieu de culture des cellules EAhy926 après une stimulation de 24h au l'U46619 et à 8-iso-PGF_{2α} (0,1, 1, 10 et 30 μM) (Moyennes ± S.D.).

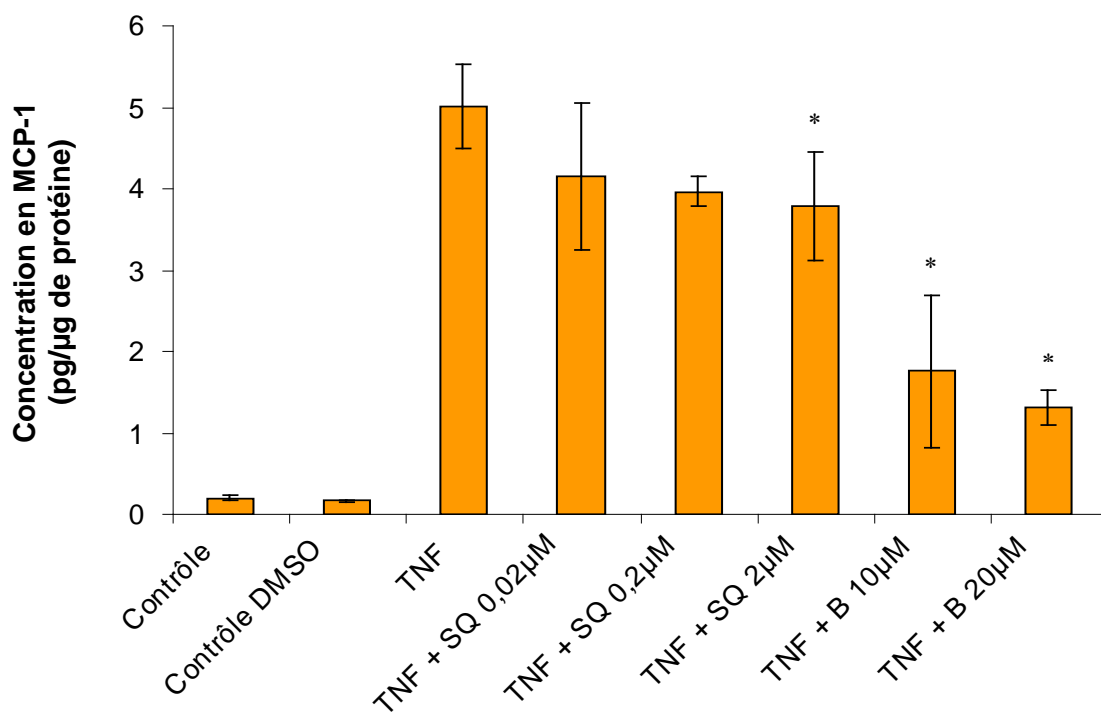


Figure 4: Dosage du MCP-1 (pg/μg de protéine) dans le milieu de culture des cellules EAhy926 après une stimulation au TNFα à 1 ng/mL de 6 heures précédée ou non d'une incubation d'une heure avec le SQ29548 aux concentrations de 0,02, 0,2, 2 μM ou d'une incubation avec le BAY 11-7082 à 10 ou 20 μM (moyenne ± SD). La valeur de p a été calculée par comparaison avec la concentration moyenne en MCP-1 après une stimulation au TNFα, *p<0,05.

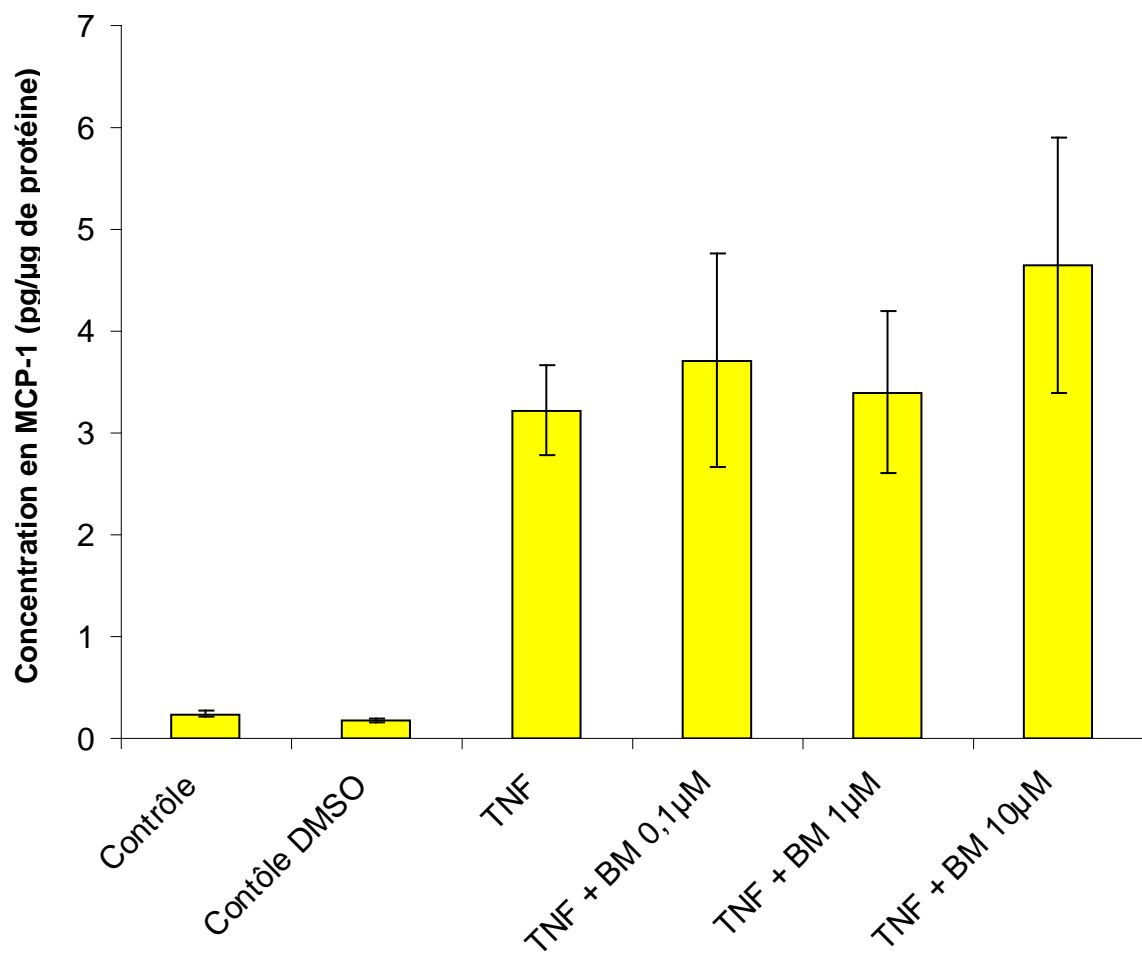


Figure 5 : Dosage du MCP-1 (pg/μg de protéine) dans le milieu de culture des cellules EAhy926 après une stimulation au TNFα (1 ng/mL) de 6 heures précédée ou non d'une incubation d'une heure avec le BM-573 aux concentrations de 0,1, 1 et 10 μM (moyenne ± SD).

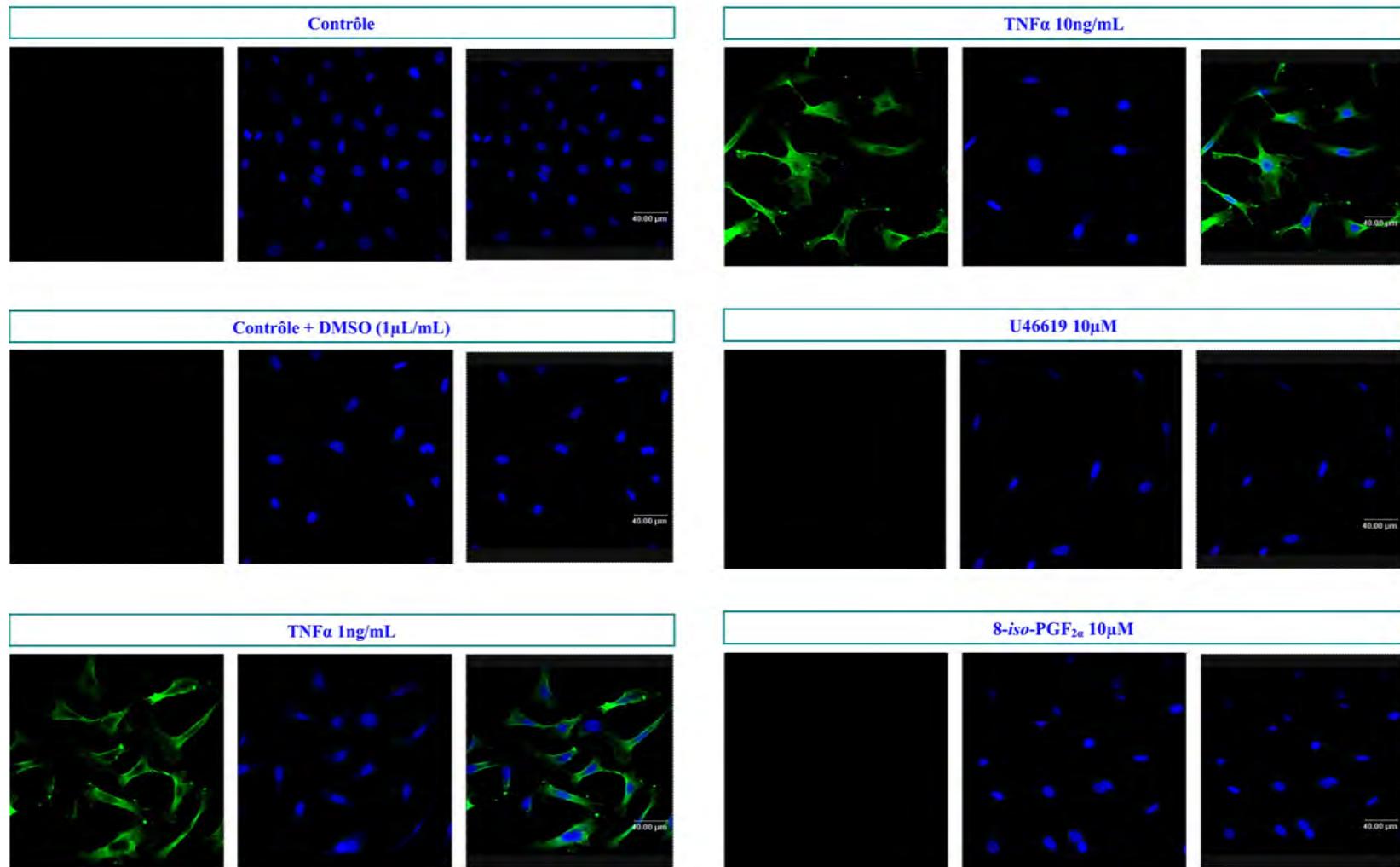


Figure 6: Photographies en microscopie confocale à fluorescence des cellules Eahy926 non perméabilisées dont le noyau est marqué en bleu par le To-Pro 3 et dont la protéine membranaire ICAM-1 est marquée en vert par l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 488. Les conditions de stimulations sont indiquées au dessus des photographies. Les photographies à gauche reprennent la fluorescence émise dans le vert, celle au centre la fluorescence émise dans le bleu et celle de droite représente la superposition des deux images.

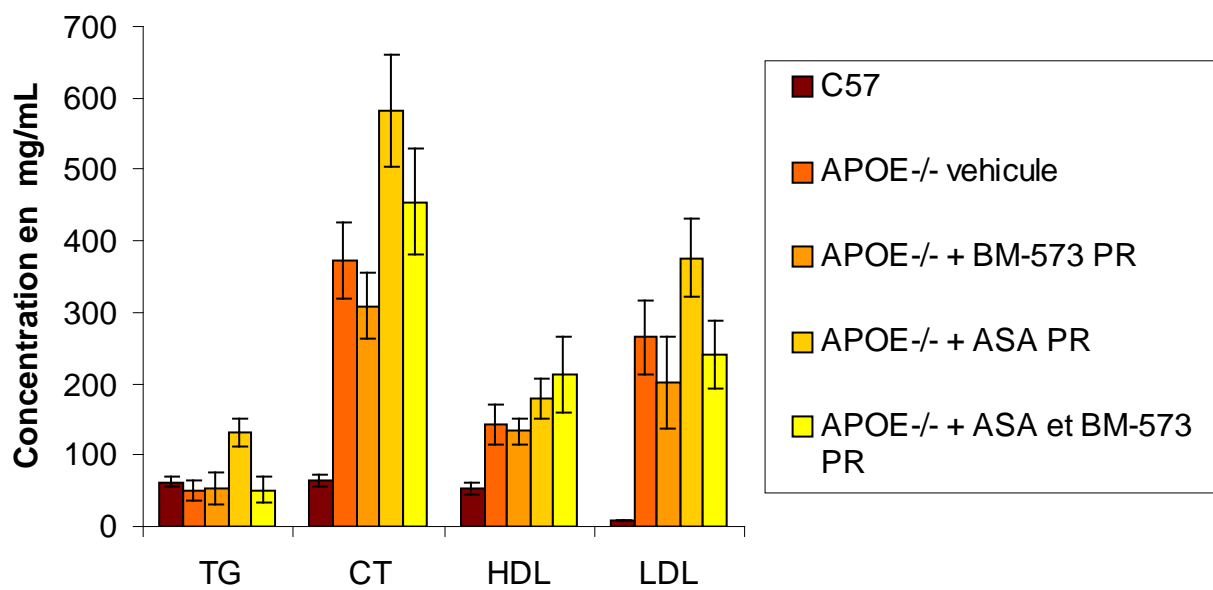
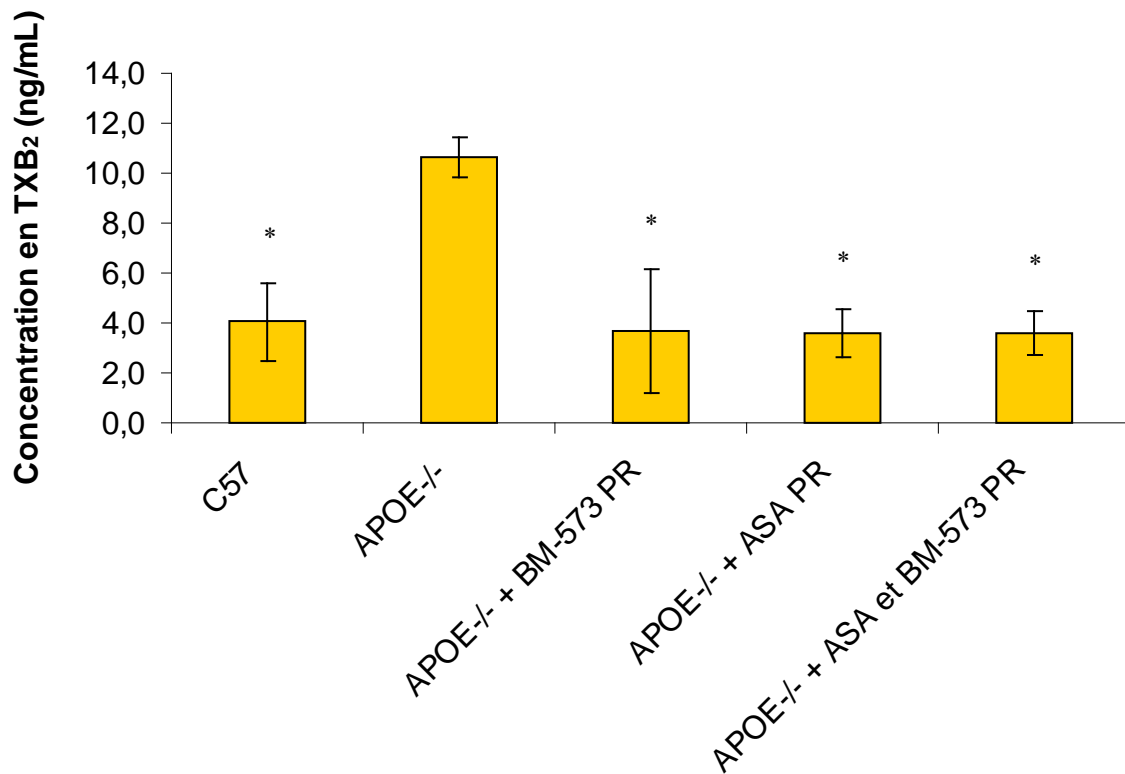
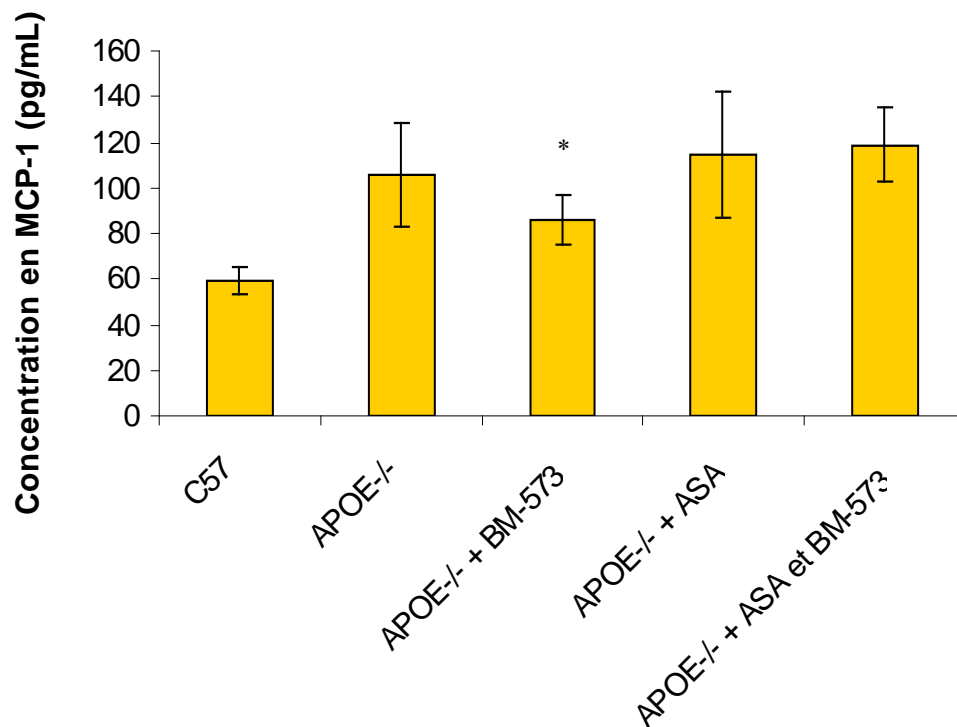


Figure 7: Dosage plasmatique des triglycérides (TG), du cholestérol total (CT), des HDL et des LDL chez les souris mâles de 15 semaines C57BL/6J et apoE^{-/-} traitées ou non à l'aspirine (ASA) à 20-26 mg/kg et/ou au BM-573 en préventif (PR) à 2-2,6 mg/kg durant 9 semaines.



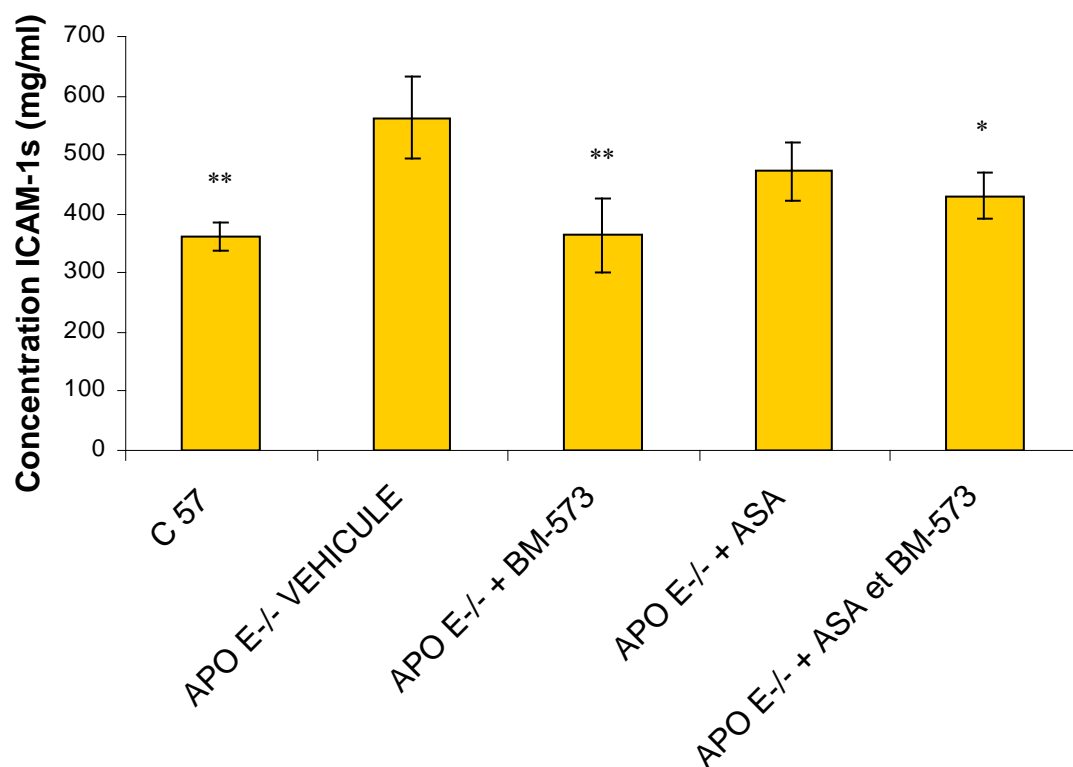
Souris	Traitement en préventif	Concentration en TXB ₂ (ng/mL)
<i>C57bl/6J</i> (n=4)	Placebo	4,0 ± 1,5 *
<i>apoE^{-/-}</i> (n=5)	Placebo	10,6 ± 0,8
<i>apoE^{-/-}</i> (n=6)	BM-573	3,7 ± 2,5 *
<i>apoE^{-/-}</i> (n=5)	Aspirine	3,6 ± 0,9 *
<i>apoE^{-/-}</i> (n=5)	BM-573 + aspirine	3,6 ± 0,9 *

Figure 8: Dosage plasmatique du TXB₂ chez les souris mâles de 15 semaines C57BL/6J et apoE^{-/-} traitées (9 semaines) ou non à l'aspirine à 20-26 mg/kg et/ou au BM-573 en préventif à 2-2,6 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne obtenue pour chaque groupe ± écart type (SD) ; n représente le nombre d'animaux. La valeur de p est calculée par comparaison au groupe témoin positif, *p <0.05.



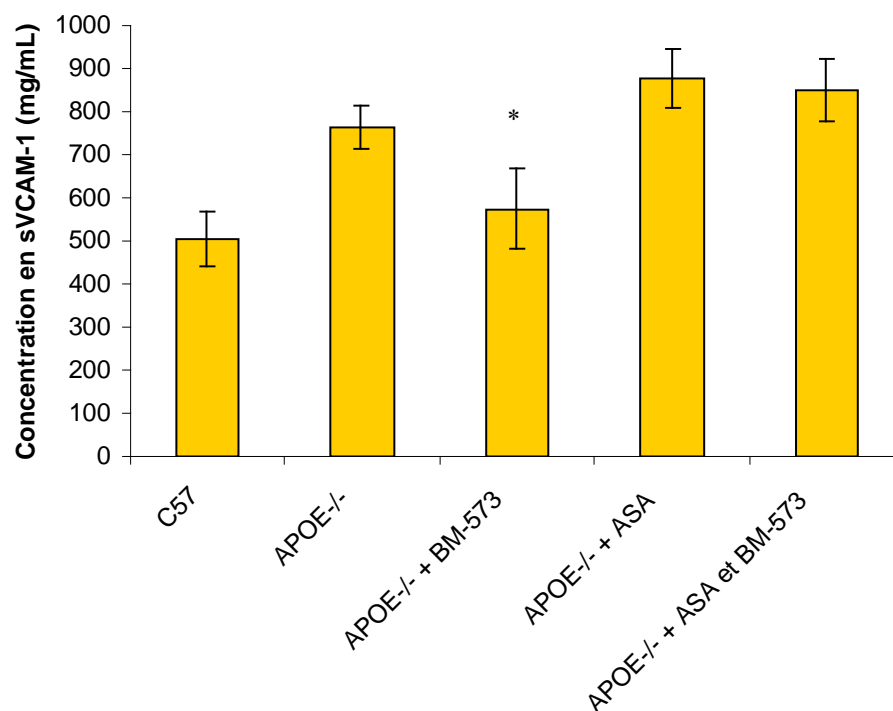
Souris	Traitement en préventif	Concentration MCP-1 (pg/mL)
<i>C57bl/6J</i> (n=4)	Placebo	59 ± 6
<i>apoE^{-/-}</i> (n=5)	Placebo	105 ± 23
<i>apoE^{-/-}</i> (n=6)	BM-573	86 ± 11 *
<i>apoE^{-/-}</i> (n=5)	Aspirine	115 ± 28
<i>apoE^{-/-}</i> (n=5)	BM-573 + aspirine	119 ± 17

Figure 9: Dosage plasmatique de MCP-1 chez les souris mâles de 15 semaines C57BL/6J et apoE^{-/-} traitées (9 semaines) ou non à l'aspirine à 20-26 mg/kg et/ou au BM-573 à 2-2,6 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne obtenue pour chaque groupe ± écart type (SD) ; n représente le nombre d'animaux. La valeur de p est calculée par comparaison au groupe témoin positif, *p <0.05.



Souris	Traitement en préventif	Concentration sICAM-1 (mg/mL)
<i>C57bl/6J</i> (n=4)	Placebo	361 ± 24 **
<i>apoE^{-/-}</i> (n=5)	Placebo	563 ± 69
<i>apoE^{-/-}</i> (n=6)	BM-573	364 ± 62 **
<i>apoE^{-/-}</i> (n=5)	Aspirine	473 ± 48
<i>apoE^{-/-}</i> (n=5)	BM-573 + aspirine	430 ± 40 *

Figure 10: Dosage plasmatique de ICAM-1 soluble chez les souris mâles de 15 semaines C57BL/6J et apoE^{-/-} traitées (9 semaines) ou non à l'aspirine (ASA) à 20-26 mg/kg et/ou au BM-573 en préventif (PR) à 2-2,6 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne obtenue pour chaque groupe ± écart type (SD) ; n représente le nombre d'animaux. La valeur de p est calculée par comparaison au groupe témoin positif, *p < 0.05, **p < 0.01.

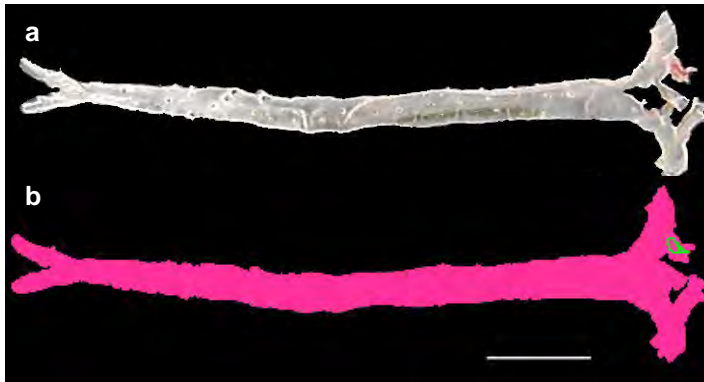


Souris	Traitement en préventif	Concentration sVCAM-1 (mg/mL)
<i>C57bl/6J</i> (n=4)	placebo	506 ± 64
<i>apoE</i> ^{-/-} (n=5)	placebo	763 ± 50
<i>apoE</i> ^{-/-} (n=6)	BM-573	575 ± 95 *
<i>apoE</i> ^{-/-} (n=5)	Aspirine	878 ± 68
<i>apoE</i> ^{-/-} (n=5)	BM-573 + aspirine	850 ± 74

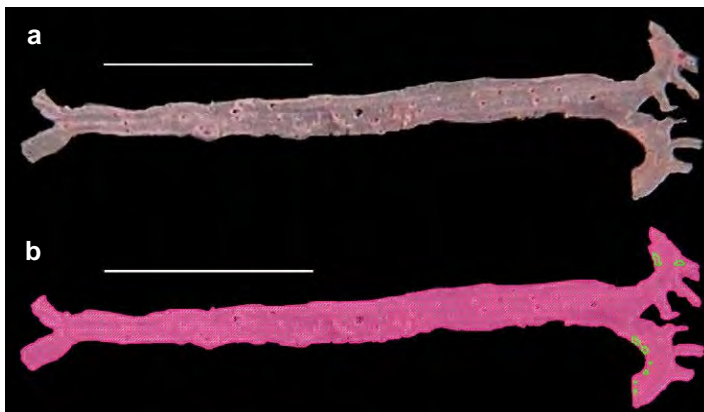
Figure 11: Dosage plasmatique de VCAM-1 soluble chez les souris mâles de 15 semaines C57BL/6J et apoE^{-/-} traitées (9 semaines) ou non à l'aspirine (ASA) à 20-26 mg/kg et/ou au BM-573 en préventif (PR) à 2-2,6 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne obtenue pour chaque groupe ± écart type (SD) ; n représente le nombre d'animaux. La valeur de p est calculée par comparaison au groupe témoin positif, *p < 0.05.



Souris apoE^{-/-} mâle âgée de 15 semaines non traitée (vehicule). (barre = 5mm)



Souris apoE^{-/-} mâle âgée de 15 semaines traitée par le BM-573 en préventif. (barre = 5mm)

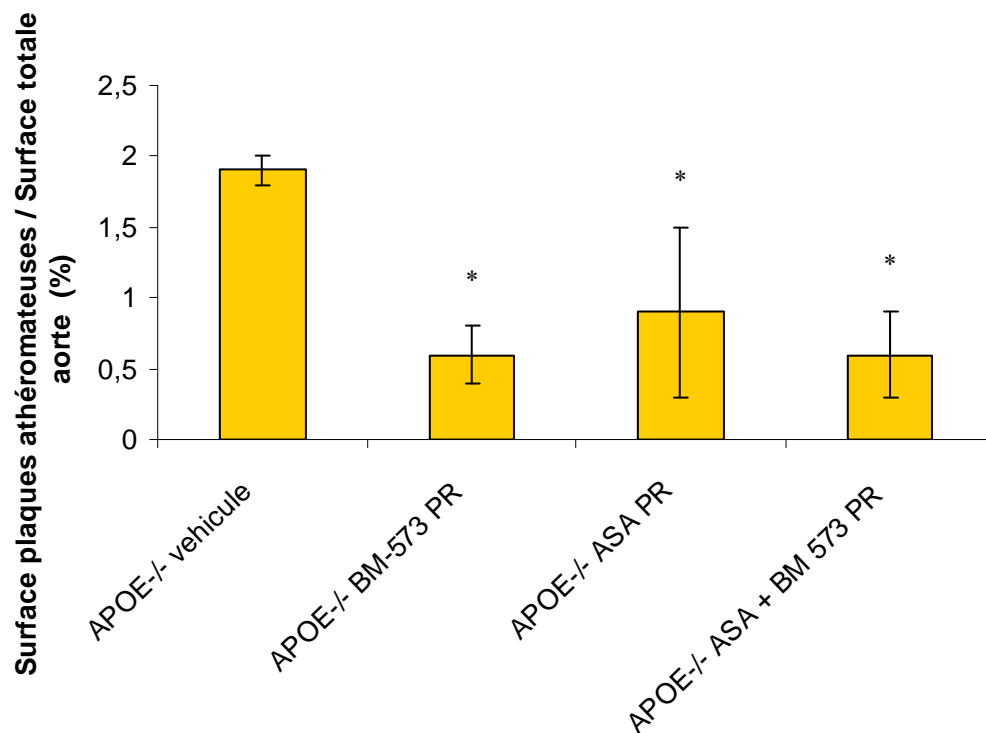


Souris apoE^{-/-} mâle âgée de 15 semaines traitée par l'aspirine en préventif. (barre = 10 mm)



Souris apoE^{-/-} mâle âgée de 15 semaines traitée par l'aspirine et par le BM-573 en préventif. (barre = 10 mm)

Figure 12: Photographie (a) et numérisation (b) des coupes longitudinales des aortes de souris colorées en rouge au sudan IV..



Souris	Traitement en préventif	% plaques
<i>apoE</i> ^{-/-} (n=4)	placebo	1,9 ± 0.1
<i>apoE</i> ^{-/-} (n=4)	BM-573	0,6 ± 0.2 *
<i>apoE</i> ^{-/-} (n=4)	Aspirine	0,9 ± 0.6 *
<i>apoE</i> ^{-/-} (n=4)	BM-573 + aspirine	0,6 ± 0.4 *

Figure 13: Quantification de la surface des plaques fibro-lipidiques par la méthode « en face » des souris apoE^{-/-} mâles de 15 semaines traitées (9 semaines) ou non au BM-573 à 2-2,6 mg/kg (n=4) et/ou à l'aspirine à 20-26 mg/kg (n=4). Les résultats sont exprimés en moyenne obtenue pour chaque groupe ± l'écart type (SD) ; n représente le nombre d'échantillons. La valeur de p est calculée en comparaison au groupe témoin positif, *p <0.05.

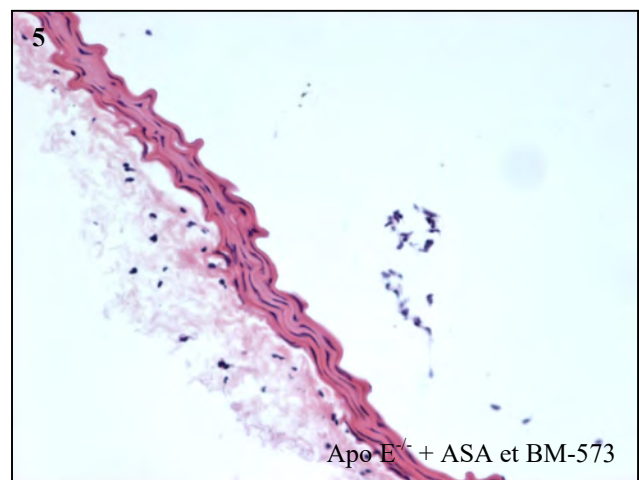
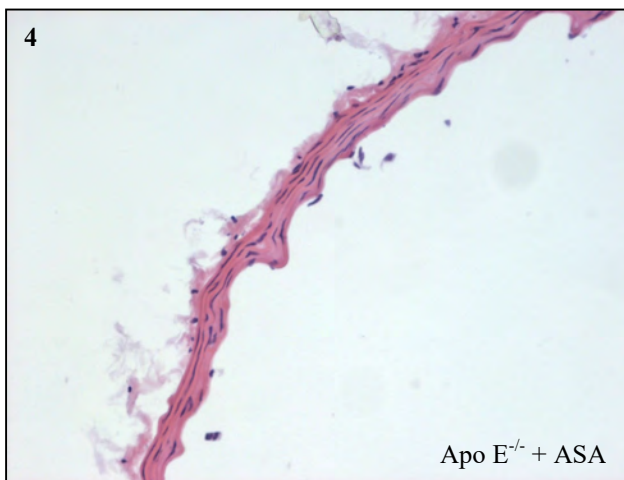
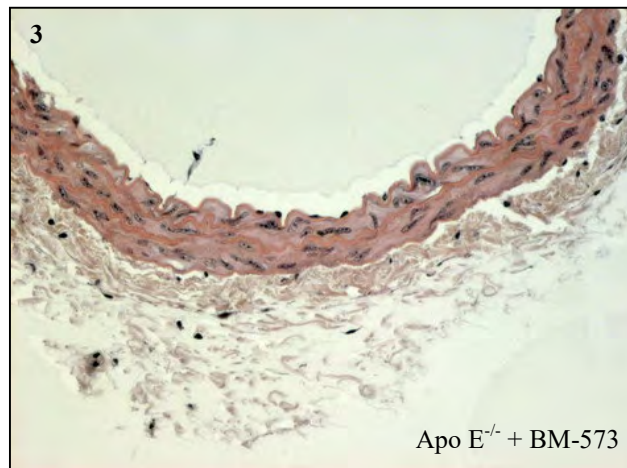
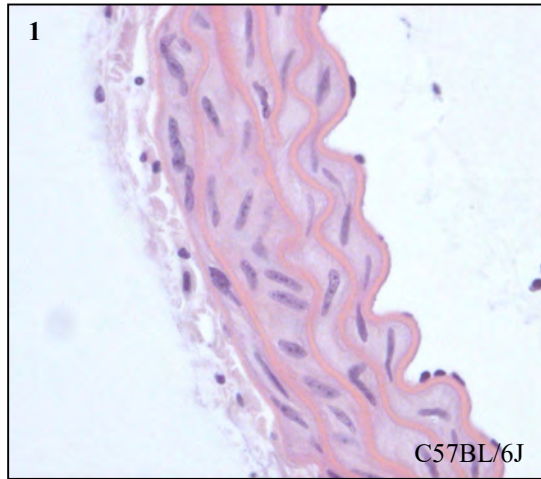


Figure 14: Coupes histologiques transversales d'aortes de souris colorées à l'H&E. La photo 1 montre une coupe réalisée dans la partie abdominale d'une aorte d'une souris C57BL/6J (contrôle négatif). La photo 2 montre un coupe réalisée dans la partie abdominale d'une l'aorte de souris apoE^{-/-} non traitées (contrôle positif). La photo 3 montre une coupe réalisée dans la partie abdominale d'une aorte de souris apoE^{-/-} traitée au BM-573 (2-2,6 mg/kg). La photo 4 montre une coupe réalisée dans la partie thoracique d'une aorte de souris apoE^{-/-} traitée à l'aspirine (20-26 mg/kg). La photo 5 montre une coupe réalisée dans la partie thoracique d'une aorte de souris apoE^{-/-} traitée à l'aspirine et au BM-573. (grossissement 200x)

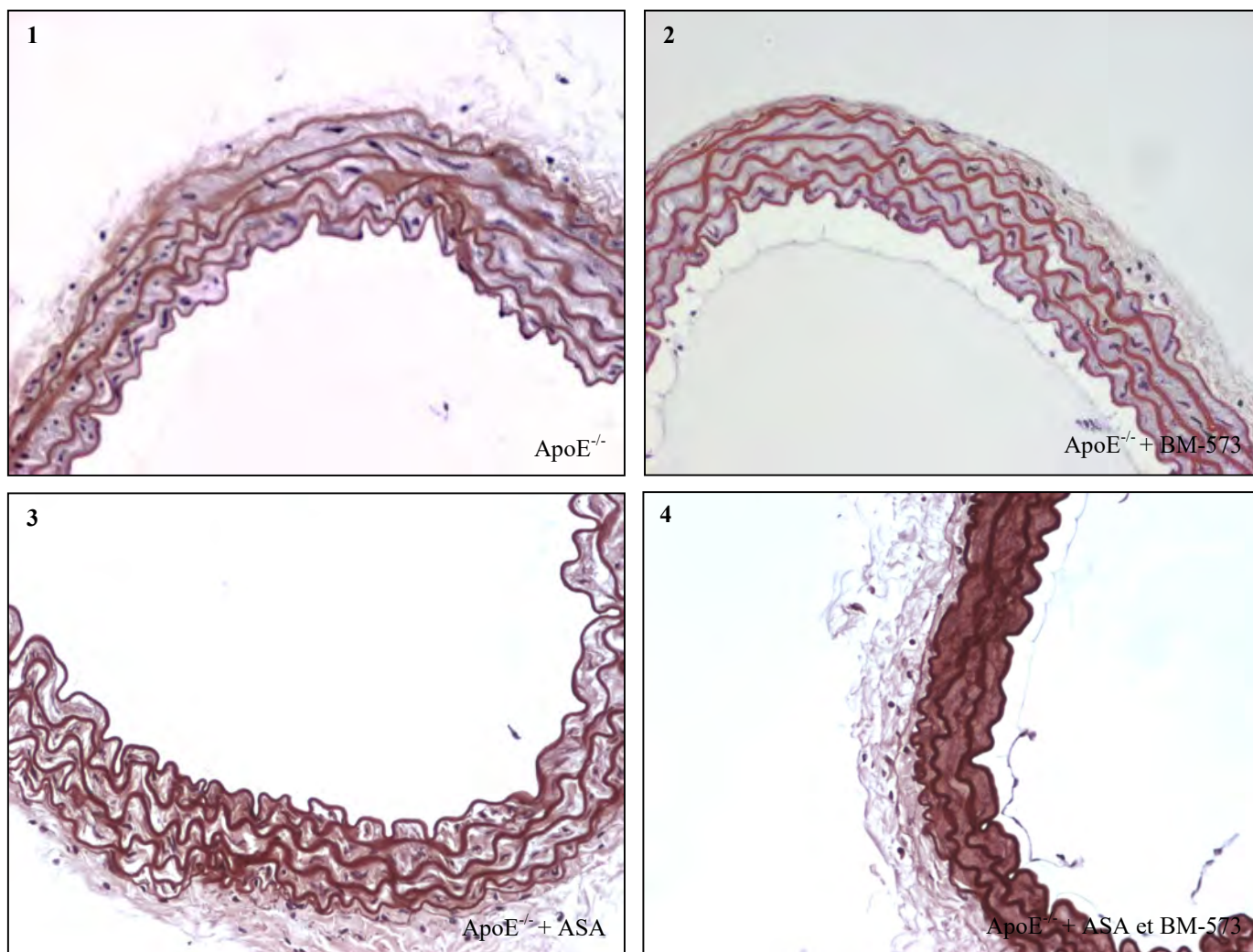


Figure 15: Coupes histologiques transversales d'aortes de souris colorées à l'orcéine. La photo 1 montre un coupe réalisée dans la partie thoracique d'une l'aorte de souris apoE^{-/-} non traitées (contrôle positif). La photo 2 montre une coupe réalisée dans la partie thoracique d'une aorte de souris apoE^{-/-} traitée au BM-573 (2-2,6 mg/kg). La photo 3 montre une coupe réalisée dans la partie thoracique d'une aorte de souris apoE^{-/-} traitée à l'aspirine (20-26 mg/kg). La photo 4 montre une coupe réalisée dans la partie thoracique d'une aorte de souris apoE^{-/-} traitée à l'aspirine et au BM-573 (grossissement 200x).

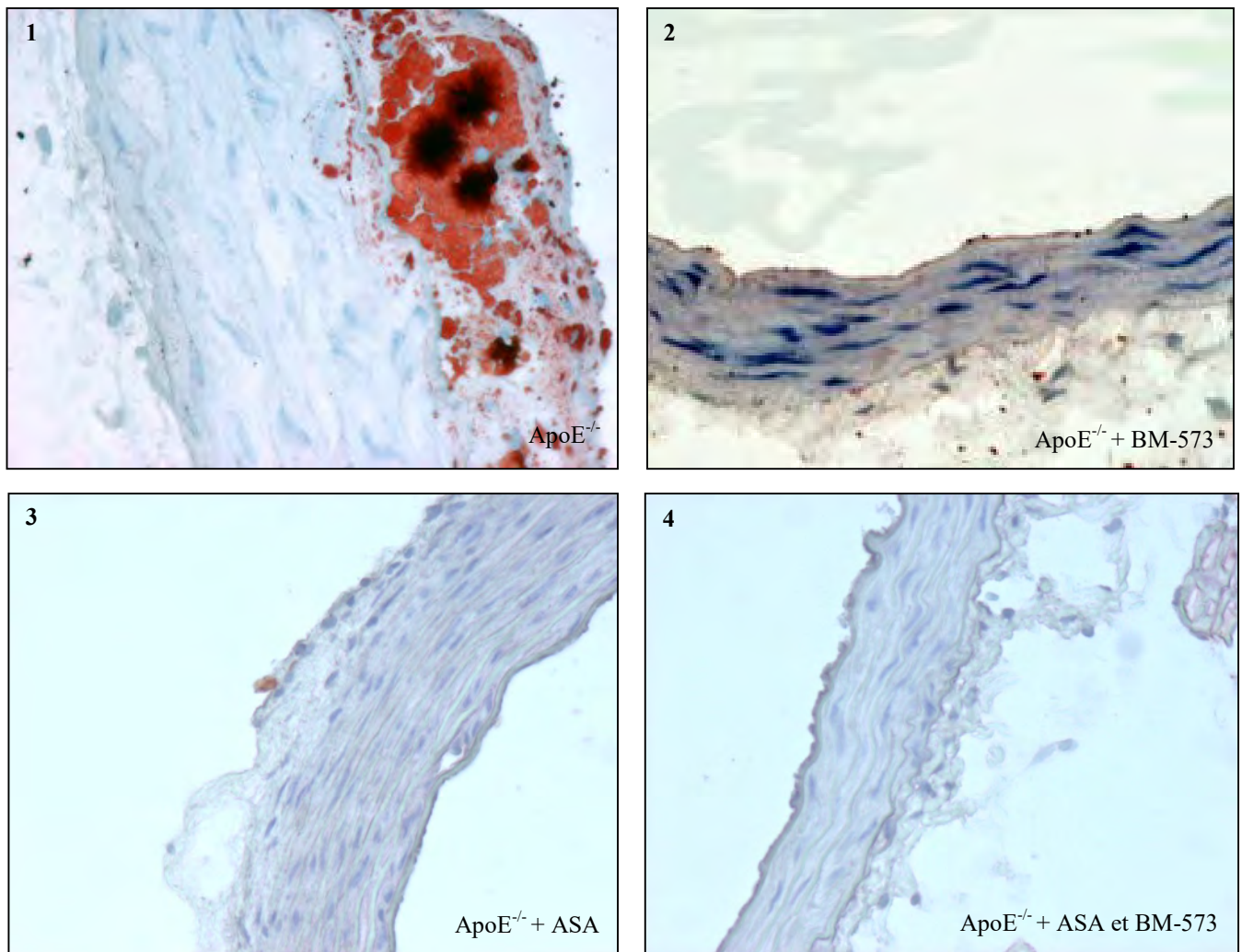


Figure 16: Coupes histologiques transversales d'aortes de souris colorées à l'Oil Red O. La photo 1 (400x) montre un coupe réalisée dans la crosse d'une l'aorte de souris apoE^{-/-} non traitées (contrôle positif). La photo 2 (200x) montre une coupe réalisée dans la crosse d'une aorte de souris apoE^{-/-} traitée au BM-573 (2-2,6 mg/kg). La photo 3 (400x) montre une coupe réalisée dans la crosse d'une aorte de souris apoE^{-/-} traitée à l'aspirine (20-26 mg/kg). La photo 4 (400x) montre une coupe réalisée dans la crosse d'une aorte de souris apoE^{-/-} traitée à l'aspirine et au BM-573.